

multivariate analysis 1984, P16

(26) Warnick, G; Clin Chem 1990, V36, P15 MEDLINE

(27) Wieland, H; J Lipid Res 1983, V24, P904 HCAPLUS

IT 57-88-5, Cholest-5-en-3-ol (3 $\beta$ )-, biological studies

RL: BOC (Biological occurrence); BSU (Biological study, unclassified);

BIOL (Biological study); OCCU (Occurrence)

(blood; homogeneous assay for measuring low-d. lipoprotein

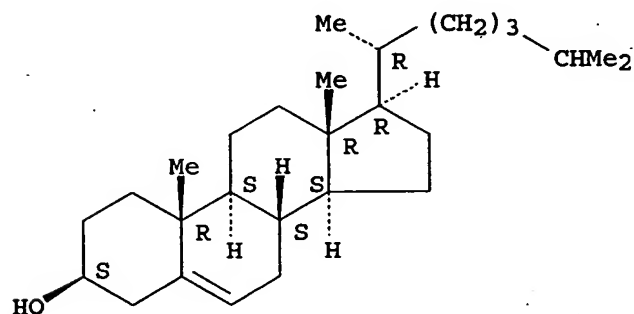
cholesterol in serum with triblock copolymer and

$\alpha$ -cyclodextrin sulfate)

RN 57-88-5 HCAPLUS

CN Cholest-5-en-3-ol (3 $\beta$ )- (9CI) (CA INDEX NAME)

Absolute stereochemistry.



IT 9026-00-0, Cholesterol esterase

9028-76-6, Cholesterol oxidase

RL: ARG (Analytical reagent use); ANST (Analytical study); USES (Uses)

(homogeneous assay for measuring low-d. lipoprotein

cholesterol in serum with triblock copolymer and

$\alpha$ -cyclodextrin sulfate)

RN 9026-00-0 HCAPLUS

CN Esterase, cholesterol (9CI) (CA INDEX NAME)

\*\*\* STRUCTURE DIAGRAM IS NOT AVAILABLE \*\*\*

RN 9028-76-6 HCAPLUS

CN Oxidase, cholesterol (9CI) (CA INDEX NAME)

\*\*\* STRUCTURE DIAGRAM IS NOT AVAILABLE \*\*\*

L88 ANSWER 22 OF 29 HCAPLUS COPYRIGHT 2004 ACS on STN

AN 1997:717699 HCAPLUS

DN 128:32112

ED Entered STN: 13 Nov 1997

TI Test reagent for determination of HDL-  
cholesterol in lipid fraction of serum or plasma

IN Fujii, Takayuki; Tsubota, Hiroyuki; Hama, Michio; Kazahaya, Kenji;  
Tsuchiya, Hozumi

PA Iatron Laboratories, Inc., Japan

SO Jpn. Kokai Tokkyo Koho, 8 pp.

CODEN: JKXXAF

DT Patent

LA Japanese

IC ICM C12Q001-60

ICS G01N033-92

CC 9-5 (Biochemical Methods)

FAN.CNT 1

	PATENT NO.	KIND	DATE	APPLICATION NO.	DATE
PI	JP 09285298	A2	19971104	JP 1996-122825	19960422
PRAI	JP 1996-122825		19960422		

AB The disclosed test reagent comprises **cholesterol esterase, cholesterol oxidase, cholesterol dehydrogenase, polyanion, divalent metal salt, nonionic surfactant** and albumin that is different from the endogenous albumin of serum or plasma sample. The test reagent is suitable for use in an automatic anal. apparatus

ST albumin reagent automated analyzer **HDL cholesterol**

IT Polyelectrolytes  
(anionic; test reagent containing exogenous albumin for determination of serum or plasma **HDL-cholesterol**)

IT Lipids, analysis  
RL: AMX (Analytical matrix); PUR (Purification or recovery); ANST (Analytical study); PREP (Preparation)  
(fraction; test reagent containing exogenous albumin for determination of serum or plasma **HDL-cholesterol**)

IT Lipoproteins  
RL: ANT (Analyte); THU (Therapeutic use); ANST (Analytical study); BIOL (Biological study); USES (Uses)  
(high-d.; test reagent containing exogenous albumin for determination of serum or plasma **HDL-cholesterol**)

IT Heart, disease  
(infarction; test reagent containing exogenous albumin for determination of serum or plasma **HDL-cholesterol**)

IT Surfactants  
(nonionic; test reagent containing exogenous albumin for determination of serum or plasma **HDL-cholesterol**)

IT Arteriosclerosis  
Blood plasma  
Blood serum  
(test reagent containing exogenous albumin for determination of serum or plasma **HDL-cholesterol**)

IT Albumins, analysis  
RL: ARU (Analytical role, unclassified); ANST (Analytical study)  
(test reagent containing exogenous albumin for determination of serum or plasma **HDL-cholesterol**)

IT Salts, analysis  
RL: ARU (Analytical role, unclassified); ANST (Analytical study)  
(two-one; test reagent containing exogenous albumin for determination of serum or plasma **HDL-cholesterol**)









IT 57-88-5, Cholesterol, analysis  
RL: ANT (Analyte); THU (Therapeutic use); ANST (Analytical study); BIOL (Biological study); USES (Uses)  
(test reagent containing exogenous albumin for determination of serum or plasma **HDL-cholesterol**)

IT 9026-00-0, Cholesterol esterase  
9028-76-6, Cholesterol oxidase  
67775-34-2, Cholesterol dehydrogenase  
RL: ARG (Analytical reagent use); THU (Therapeutic use); ANST (Analytical study); BIOL (Biological study); USES (Uses)  
(test reagent containing exogenous albumin for determination of serum or plasma **HDL-cholesterol**)


IT 29836-26-8 78617-12-6 85618-21-9  
RL: ARU (Analytical role, unclassified); ANST (Analytical study)  
(test reagent containing exogenous albumin for determination of serum or plasma **HDL-cholesterol**)


IT 57-88-5, Cholesterol, analysis  
RL: ANT (Analyte); THU (Therapeutic use); ANST (Analytical study); BIOL (Biological study); USES (Uses)  
(test reagent containing exogenous albumin for determination of serum or plasma **HDL-cholesterol**)

RN 57-88-5 HCAPLUS

**DialogWeb**        

[Guided Search](#) [new search](#) [favorites](#) [settings](#) [order](#) [cost](#) [logoff](#) [help](#)

 Dynamic Search: INPADOC/Family and Legal Status, Derwent World Patents Index®

 Records for: **PN=JP 09285298** [save as alert...](#) [save strategy only...](#)

Output  Format: **Long** Output as: **Browser** [display/send](#)

Modify  [refine search](#) [back to picklist](#)

select  [all](#) [none](#) **Records 1 of 1 In long Format**

☐ 1. **4/34/1 (Item 1 from file: 351)**

011609626

WPI Acc No: 1998-026754/ 199803

High density lipoprotein cholesterol content measurement in blood - involves using reagent comprising cholesterol, esterase, cholesterol oxidase of cholesterol dehydrogenase for performing enzyme reaction.

Patent Assignee: IATRON LAB INC (IATR )

Number of Countries: 001 Number of Patents: 001

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Week
JP 9285298	A	19971104	JP 96122825	A	19960422	199803 B

Priority Applications (No Type Date): JP 96122825 A 19960422

Patent Details:

Patent No	Kind	Lan	Pg	Main IPC	Filing Notes
JP 9285298	A		8	C12Q-001/60	

Abstract (Basic): JP 9285298 A

High density lipoprotein cholesterol content measurement in blood plasma or blood serum involves adding a reagent comprising cholesterol esterase, cholesterol oxidase or cholesterol dehydrogenase and albumin to a specimen for enzyme reaction.

USE - The process is used for diagnosis of atheroma, arteriosclerosis or myocardial infarction.

ADVANTAGE - Precise measurement of high density lipoprotein cholesterol may be effected.

Dwg. 0/0

Derwent Class: B04; D16; S03

International Patent Class (Main): C12Q-001/60

International Patent Class (Additional): G01N-033/92

Derwent WPI (Dialog® File 351): (c) 2005 Thomson Derwent. All rights reserved.

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平9-285298

(43) 公開日 平成9年(1997)11月4日

(51) Int. Cl. <sup>6</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 Q 1/60		7823-4B	C 1 2 Q 1/60	
G 0 1 N 33/92			G 0 1 N 33/92	A

審査請求 未請求 請求項の数7 F D (全 8 頁)

(21) 出願番号 特願平8-122825

(22) 出願日 平成8年(1996)4月22日

(71) 出願人 000138277

株式会社ヤトロン

東京都千代田区東神田1丁目11番4号

(72) 発明者 藤井 隆行

東京都千代田区東神田1丁目11番4号 株式会社ヤトロン内

(72) 発明者 坪田 博幸

東京都千代田区東神田1丁目11番4号 株式会社ヤトロン内

(72) 発明者 濱 三知夫

東京都千代田区東神田1丁目11番4号 株式会社ヤトロン内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 HDL-コレステロールの測定方法及び測定用試薬

(57) 【要約】

【課題】 血清または血漿試料中の高密度リポ蛋白 (HDL)-コレステロールを、遠心操作を行うことなく、簡便な操作で測定が可能な方法を提供する。

【解決手段】 少なくともコレステロールエステラーゼとコレステロールオキシダーゼまたはコレステロールデヒドロゲナーゼを作用させて試料中の高密度リポ蛋白 (HDL)-コレステロールを測定する方法において、試料由来のアルブミンとは別異にアルブミンを添加・存在させて前記酵素反応を行う。

1

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 少なくともコレステロールエステラーゼとコレステロールオキシダーゼまたはコレステロールデヒドロゲナーゼを作用させて試料中の高密度リボ蛋白(HDL)-コレステロールを測定する方法において、試料由来のアルブミンとは別異にアルブミンを添加・存在させて前記酵素反応を行うことを特徴とするHDL-コレステロールの測定方法。

【請求項2】 HDLを含有する試料に、ポリアニオン、2価の金属塩、非イオン性界面活性剤、コレステロールエステラーゼ、コレステロールオキシダーゼまたはコレステロールデヒドロゲナーゼを作用させ消費される物質または生成する物質を検出し試料中のHDL-コレステロールを測定する方法において、前記反応系に試料由来のアルブミンとは別異にアルブミンを添加・存在させて前記酵素反応を行うことを特徴とする請求項1に記載のHDL-コレステロールの測定方法。

【請求項3】 ポリアニオンが硫酸化多糖類であり、非イオン性界面活性剤がn-オクチル-β-グルコシド、n-オクチル-β-チオグルコシド、n-ヘプチル-β-チオグルコシドから選択される1種以上である請求項2に記載のHDL-コレステロールの測定方法。

【請求項4】 少なくともコレステロールエステラーゼとコレステロールオキシダーゼまたはコレステロールデヒドロゲナーゼを作用させて試料中の高密度リボ蛋白(HDL)-コレステロールを測定するための試薬において、更にアルブミンを共存させることを特徴とするHDL-コレステロールの測定用試薬。

【請求項5】 ポリアニオン、2価の金属塩、非イオン性界面活性剤、コレステロールエステラーゼ、コレステロールオキシダーゼまたはコレステロールデヒドロゲナーゼ、消費される物質又は生成する物質を検出するための組成物からなるHDL-コレステロールの測定用試薬において、更にアルブミンを共存させることを特徴とする請求項4に記載のHDL-コレステロールの測定用試薬。

【請求項6】 ポリアニオン、2価の金属塩、非イオン性界面活性剤を含有する第一試薬と、少なくともコレステロールエステラーゼ、コレステロールオキシダーゼまたはコレステロールデヒドロゲナーゼを含有する第二試薬とからなり、アルブミンを第一試薬に共存させることを特徴とする請求項5に記載のHDL-コレステロールの測定用試薬。

【請求項7】 ポリアニオンが硫酸化多糖類であり、非イオン性界面活性剤がn-オクチル-β-グルコシド、n-オクチル-β-チオグルコシド、n-ヘプチル-β-チオグルコシドから選択される1種以上である請求項5、6に記載のHDL-コレステロールの測定用試薬。

## 【発明の詳細な説明】

【0001】

2

【産業上の利用分野】 本発明は高密度リボ蛋白(HDL)-コレステロールの測定方法およびHDL-コレステロールの測定用試薬に関する。

【0002】

【従来の技術】 血漿又は血清中の各リポドフラクション中に含有されるコレステロールは、近年アテローム性動脈硬化症や心筋梗塞の危険度を示す診断材料として重要視されている。血清のリポドフラクションはそれぞれ脂質複合体粒子としての大きさが異なり、比重の差を利用した分離法である超遠心法に従って、カイロミクロン、超低密度リボ蛋白(Very low density lipoprotein; 以下VLDLともいう)、低密度リボ蛋白(Low density lipoprotein; 以下LDLともいう)、及び高密度リボ蛋白(High density lipoprotein; 以下HDLともいう)の4種類に分別されている。各リポドフラクションは、アポリポタンパク質と脂質に大別され、脂質は更に遊離型コレステロール、エステル型コレステロール、トリグリセリド及びリン脂質から構成されている。このため、コレステロールの測定は遊離型とエステル型の兩者について行われている。

【0003】 日常的な臨床検査では、自動分析装置を使用して酵素法による総コレステロールの測定が広く行われているが、HDL-コレステロールの測定については、試料の前処理(分画・分離操作)を行うことが必要のため、酵素法による自動分析測定(自動化)の普及が遅れていた。この試料の前処理としては、種々の沈殿法が行われており、例えばリタングステン酸とマグネシウムイオン、デキストラン硫酸とマグネシウムイオン、ヘパリンとカルシウムイオンあるいはマンガンイオン(M. Burstein and H. R. Scholnick; Adv. Lipid Res., 11, 67, 1973, G.R. Warnick et al.; Clin. Chem., 25, 596, 1979)、又はポリエチレングリコールを添加してLDL等を沈殿させて遠心操作によって上澄み液を被検試料とする方法が採用されている。詳細には、沈殿剤としてリタングステン酸とマグネシウムイオンを使った場合、これらを含有する溶液に試料(血清や血漿)を加え、HDL以外のリポドフラクションを不溶性の複合体とする。これを遠心分離することによって沈殿を除き、HDLを含む上清を回収する。分画されたHDLは総コレステロール測定用の酵素試薬で自動分析システムによる測定が可能となる。また、免疫法(C-C. Heuck, et al. Clin. Chem. 31, 252, 1985)においても沈殿剤としてアポリポタンパク質B(HDLには含まれない)に対する抗体を試料(血清や血漿)に加え、HDL以外のリポドフラクションを沈殿させる。以下同様に分画した後、はじめて上清中のHDL-コレステロールの測定を行うことができる。このように、従来の方法ではいずれも多く工程と時間を要するという欠点があった。

【0004】 最近、これら分画操作を必要としない測定法について報告が出されている(例えば、特公平6-1

6720号、特公平7-34760号、特開昭58-165800号各公報、国際出願番号PCT/JP95/00378)。すなわち、従来より主に用いられている総コレステロール測定のための酵素法としては、コレステロールエステラーゼによりコレステロールエステルを加水分解し、この酵素反応生成物であるコレステロールをコレステロールオキシダーゼにより、溶存酸素を使って酸化反応を行わせて生成される過酸化水素を、適当な被酸化性発色剤の存在下でペルオキシダーゼ反応により発色させて比色定量したり、あるいは、前記のコレステロールオキシダーゼによる酸化反応の際に消費される溶存酸素量を酸素電極で測定する方法が知られていた。

【0005】例えば、前記の各特許公報の記載によれば、前記の反応系において胆汁酸塩と共に非イオン系のポリエチレンオキシド基含有界面活性剤の存在はコレステロールエステラーゼの活性発現に重要であり、この界面活性剤なしには活性を発現しないとされている。そして、特公平6-16720号公報には、この胆汁酸塩には、脂質が豊富で比較的わずかなタンパク質を有するリポタンパク質である乳び脂粒、VLDL及びLDLのみを溶かし、その中に含有されるコレステロールを酵素反応に関与させる効果があるため、HDL-コレステロールの測定にさきがけて、これを反応させ、次いで前記の界面活性剤を添加し、HDLフラクション中に有されるコレステロールと酵素とを反応させることによってHDL-コレステロールを特異的に分別測定する方法が記載されている。また、特公平7-34760号公報には、前記と同様の系において、更に、使用する酵素を肝臓由来のコレステロールエステラーゼとし、抗LDL抗体を反応系へ添加しておくことにより、LDLやVLDLの主要構成タンパク質であるアポリタンパク質Bと前記抗体との間に抗原抗体反応による複合体を形成させ、当該酵素との反応を阻害することで総合的にHDLフラクションに対する特異性を上げる工夫を行っている。

【0006】また、国際出願番号PCT/JP95/00378は高密度リポ蛋白(HDL)以外のリポ蛋白を凝集させる試薬の存在下、HDLを含有する試料に化学修飾されたコレステロールエステラーゼ、化学修飾されたコレステロールオキシダーゼまたは化学修飾されたコレステロールデヒドロゲナーゼを作用させ、生成する過酸化水素または還元型補酵素を定量することを特徴とするHDL中のコレステロールの定量法が記載されている。

【0007】また、H. Sugiuchiらは国際出願番号PCT/JP95/00378を応用し自動分析機へ適応した新しい方法について報告している(Clin. Chem., 41, 717, 1995)。すなわち、使用する当該酵素(コレステロールエステラーゼ、及びコレステロールオキシダーゼ)にポリエチレングリコールを結合させ、化学修飾して高分子化した酵素を用いるものである。更

に、前記の高分子化酵素に加えて、種々のリビドフラクションと親和性があるとされるシクロデキストリン誘導体(具体的には、硫酸化 $\alpha$ -シクロデキストリン)を共存させることでHDL以外のリビドフラクションに対して複合体を形成させることができることが記載されている。この複合体は、前記高分子化酵素による反応を受けにくいためHDLフラクションを特異的に測定することができる。

【0008】

10 【発明が解決しようとする課題】しかし、上述の従来方法では、試薬へ新たに抗体を添加したり、反応時間が20分以上かかるなど、製造コストや測定操作上、日常使われている自動分析機への対応が不十分であったり、化学修飾した酵素を利用するには、酵素の修飾という新たな工程の増加と、酵素標品の精製度の管理や化学修飾の程度差による酵素活性変動の抑制と管理、更には修飾酵素の安定性の維持等、新たな問題点を付随することになる。また、界面活性剤のみの使用による分別では不完全さが否めない。本発明者等は、現在の臨床検査試験で

20 は、迅速で簡便な手段である自動分析装置による測定が主流である点を鑑み、従来のHDL-コレステロールの測定方法及び測定用試薬において、試料(血清又は血漿)の遠心操作を行うことなく簡便な操作で、且つ高精度の測定結果が得られる方法の開発を目的として、鋭意研究を重ねた結果本発明を完成させた。

【0009】

【課題を解決するための手段】従って、本発明は、少なくともコレステロールエステラーゼ、コレステロールオキシダーゼまたはコレステロールデヒドロゲナーゼを作用させて試料中の高密度リポ蛋白(HDL)-コレステロールを測定する方法において、試料由来のアルブミンとは別異にアルブミンを添加・存在させて前記酵素反応を行うことを特徴とするHDL-コレステロールの測定方法、に関する。更に、本発明は、少なくともコレステロールエステラーゼ、コレステロールオキシダーゼまたはコレステロールデヒドロゲナーゼを作用させて試料中の高密度リポ蛋白(HDL)-コレステロールを測定するための試薬において、更にアルブミンを共存させることを特徴とするHDL-コレステロールの測定用試薬、

40 にも関する。以下、本発明を詳細に説明する。

【0010】本発明の特徴は、従来のHDL-コレステロールの測定方法において、血清や血漿等の生体液試料に由来するアルブミンとは別に、人為的にアルブミンを反応系に存在させると、HDL-コレステロールの測定方法において使用する酵素(コレステロールエステラーゼ、コレステロールオキシダーゼまたはコレステロールデヒドロゲナーゼ)とリビドフラクション含有コレステロールとの反応に関して、アルブミンがHDL-コレステロールとの反応には影響しないが、LDL及びVLDLフラクションのコレステロールとの反応を阻害すると

50

5

いう新知見を基本とする。

【0011】本発明において、試料としては、特に哺乳動物（特にヒト）の生体液であり、具体的には血清又は血漿をそのまま用いることができる。本発明においては、前記の生体試料をコレステロールエステラーゼ及びコレステロールオキシダーゼまたはコレステロールデヒドロゲナーゼと接触させる際に、試料由来のアルブミンとは別に人為的にアルブミンを存在させることで、前記酵素とLDLコレステロール及びVLDLコレステロールとの反応を阻害させた後、係るHDLコレステロール測定の実施すれば良い。

【0012】以下の記述において、「HDL以外のリポ蛋白を凝集させる」とは、HDL以外のリポ蛋白と凝集試薬が会合状態を呈し、該リポ蛋白と酵素との反応が阻害される状態をいう。HDL以外のリポ蛋白を凝集させてHDLコレステロールを測定する反応系、具体的には、HDL以外のリポ蛋白であるLDL、VLDLおよびカイロミクロンを凝集させる凝集試薬、すなわちポリアニオンと2価の金属塩からなる凝集試薬、具体的には、デキストラン硫酸またはその塩、ポリエチレングリコール、ヘパリンまたはその塩、リンタングステン酸またはその塩もしくはこれらの組み合わせ及び2価の金属塩からなる公知の凝集試薬を用いるHDLコレステロールの測定に本発明方法を適用する場合、試料とコレステロールエステラーゼ及びコレステロールオキシダーゼまたはコレステロールデヒドロゲナーゼと接触させる際に、アルブミンを共存させておく。あるいは、試料とコレステロールエステラーゼ及びコレステロールオキシダーゼまたはコレステロールデヒドロゲナーゼと接触させる際、予めアルブミンを共存させておき、LDL及びVLDLフラクションのコレステロールとの反応を阻害し、LDL及びVLDLフラクションの反応を完全に停止することが可能となり、精度良くHDLフラクションのコレステロールだけを選択的に測定することができる。

【0013】アルブミンは、本来血清（血漿）にも含まれているため、本反応系には試料由来のアルブミンが微量存在する。しかし、HDL以外のリポ蛋白とコレステロールエステラーゼ及びコレステロールオキシダーゼまたはコレステロールデヒドロゲナーゼの反応を阻害するためには、試料由来のアルブミンでは不十分であることは以下の実施例で確認されている。反応系におけるアルブミン量は、0.01~20.0重量%、好ましくは0.1~20.0重量%、より好ましくは0.5~10.0重量%のアルブミンを存在させておくことが必須であり、この範囲内にコントロールするために試料由来のアルブミンとは別異にアルブミンを添加することが必要となる。

【0014】HDL以外のリポ蛋白を凝集させてHDLコレステロールを測定する反応系の場合、遠心分離等

6

の操作を行わずに、アルブミン、ポリアニオン、2価の金属塩、非イオン性界面活性剤と試料を接触させることにより、被検試料中のLDLコレステロール及びVLDLコレステロールと酵素とは反応しないが、HDLコレステロールと酵素と反応するようになる。次いでコレステロールエステラーゼ、コレステロールオキシダーゼまたはコレステロールデヒドロゲナーゼを作用させ、HDLコレステロールのみと前記各酵素との酵素反応により消費される物質（例えば、補酵素）又は生成される物質（例えば、過酸化水素）を、公知の手段により検出し、HDLコレステロールを定量することができる。例えば、過酸化水素を検出する場合には、適当な被酸化性発色剤とベルオキシダーゼの存在下に生成する過酸化水素を発色させて、分光学的に比色測定すれば良い。また、コレステロールデヒドロゲナーゼを用いる場合、NAD(P)から生成するNAD(P)Hを例えば波長340nmで分光学的にモニターすることで検出することができる。

【0015】過酸化水素は、公知の方法で、例えば、適当な被酸化性発色剤の存在下にベルオキシダーゼの反応により発色させることができる。被酸化性発色剤としては、3-ハイドロキシ-2,4,6-トリヨードベンゾイックアシド(HTIBA)やN-エチル-N-スルホプロピル-m-トルイジン(ESPT)と4-アミノアンチピリン(4-AP)が好適であり、自動分析装置による測定では、波長510nm(HTIBAを使用する場合)付近、又は546nm(ESPTを使用する場合)付近における吸光度を測定すればよい。

【0016】次に、従来のHDLコレステロール測定用試薬にアルブミンを共存させた試薬について説明する。原則としてコレステロールエステラーゼ、コレステロールオキシダーゼまたはコレステロールデヒドロゲナーゼを作用させてHDLコレステロールを測定する試薬であれば本発明は適用可能である。具体的には、例えばHDL以外のリポ蛋白を凝集させてHDLコレステロールを測定する試薬においては、HDL以外のリポ蛋白を凝集させる凝集試薬、すなわちポリアニオンと2価の金属塩からなる凝集試薬、具体的には、デキストラン硫酸またはその塩、ポリエチレングリコール、ヘパリンまたはその塩、リンタングステン酸またはその塩もしくはこれらの組み合わせ及び2価の金属塩からなる凝集試薬、更に非イオン性界面活性剤、コレステロールエステラーゼ、コレステロールオキシダーゼまたはコレステロールデヒドロゲナーゼ、酵素反応によって消費される物質（例えば、補酵素）又は生成される物質（例えば、過酸化水素）を検出するための組成物に、アルブミンを存在させたものであれば良い。

【0017】アルブミンとしては、反応系に0.01~20.0重量%、好ましくは0.1~20.0重量%、より好ましくは0.5~10.0重量%となるように試

7

薬中に含有させる。アルブミン濃度が0.01重量%より少ないと阻害効果が不十分であり、10.0重量%を越えると試薬の粘度が高くなり、測定の再現性の悪化を招くという問題点が生じる。また、アルブミンの由来は特に限定されず、ヒト、ウシ、ヒツジ、ウマ等の哺乳動物由来のほか遺伝子工学的に産生されたものでも使用できる。上記試薬の場合、アルブミンと併用するポリアニオンとしては、硫酸化多糖類が好ましく、特にデキストラン硫酸がHDL以外のリポ蛋白と酵素との反応を効果的に阻害するため、デキストラン硫酸を使用することが好ましい。デキストラン硫酸としては、反応系に1 $\mu$ M~500 $\mu$ M、好ましくは5.0 $\mu$ M~100 $\mu$ Mの分子量10000~500000のデキストラン硫酸またはその塩、あるいは10 $\mu$ M~5mM、好ましくは50 $\mu$ M~1mMの分子量1000~10000のデキストラン硫酸またはその塩となるように試薬中に含有させる。デキストラン硫酸濃度が下限より少ないと阻害効果が不十分であり、上限を越えると酵素の阻害による反応性低下という問題点が生じる。2価の金属塩としてはマグネシウム塩、カルシウム塩、マンガン塩であり、塩としては、水溶性無機塩、例えば、ハロゲン化物（例えば、塩化物、臭化物、又はヨウ化物）又は硫酸化物、あるいは、水溶性有機塩、例えば、酢酸塩又はクエン酸塩として用いることができる。2価の金属としては、反応系に1~100mM、好ましくは5~50mMの濃度となるように試薬中に含有させる。2価の金属塩の濃度が下限より少ないと阻害効果が不十分であり、上限を越えると保存による金属の塩析や酵素の阻害による反応性低下という問題点が生じる。

【0018】非イオン性界面活性剤としては、公知の非イオン性界面活性剤全般を使用することができるが、上記試薬の場合、アルブミンと併用する非イオン性界面活性剤としては特にn-オクチル- $\beta$ -グルコシド、n-オクチル- $\beta$ -チオグルコシド、n-ヘプタチル- $\beta$ -チオグルコシドがHDL以外のリポ蛋白と酵素との反応を好適に阻害するため、これらから選択される1種以上のものを使用することが好ましい。その反応系における濃度がn-オクチル- $\beta$ -グルコシドの場合、0.01~2.0%、好ましくは0.1~1.0%となるように試薬中に含ませる。n-オクチル- $\beta$ -チオグルコシドの場合、0.01~1.0%、好ましくは0.05~0.5%で用いる。n-ヘプタチル- $\beta$ -チオグルコシドの場合、0.01~2.0%、好ましくは0.1~1.0%で用いる。あるいは、これらを前記濃度範囲内で混合して使用しても良い。前記非イオン性界面活性剤の濃度が下限より少ないと酵素との反応が不十分となり、上限を越えるとHDL-コレステロールに対する阻害効果が低下するという問題点が生じる。

【0019】コレステロールエステラーゼ及びコレステロールオキシダーゼ等の酵素としては、ポリエチレング

8

リコール(PEG)等を結合させて化学修飾した酵素、又は化学修飾していない酵素のいずれも用いることができる。酵素の由来も限定されず、コレステロールエステラーゼとしては、例えば、シュドモナス属の微生物や、牛又は豚の脾臓由来のコレステロールエステラーゼを用いることができる。また、コレステロールオキシダーゼとしては、例えば、ストレプトマイセス属又はノカルディヤ属の微生物由来のコレステロールオキシダーゼを用いることができる。コレステロールデヒドロゲナーゼについても同様であり、例えば、微生物由来のものを使用することができる。それらの酵素の添加量も特に限定されないが、例えば、0.1u/ml~20u/ml、より好ましくは0.2u/ml~10u/mlである。

【0020】コレステロールエステラーゼ、コレステロールオキシダーゼまたはコレステロールデヒドロゲナーゼを作用させ、HDL-コレステロールのみと前記各酵素との酵素反応により消費される物質（例えば、補酵素）又は生成される物質（例えば、過酸化水素）を検出するには、公知の組成物を用いれば良い。例えば、過酸化水素を検出する場合には、適当な被酸化性発色剤とベルオキシダーゼの存在下に生成する過酸化水素を発色させて、分光学的に比色測定ができ、例えば、適当な被酸化性発色剤の存在下にベルオキシダーゼの反応により発色させることができる。被酸化性発色剤としては、3-ハイドロキシ-2,4,6-トリヨードベンゾイックアシド(HTIBA)やN-エチル-N-スルホプロピル-m-トルイジン(ESPT)と4-アミノアンチピリン(4-AP)が好適であり、HTIBAやESPTは0.1mM~5mMの濃度範囲で、そして4-APは0.05mM~2mMの濃度範囲で適宜含有させることができる。

【0021】本発明のHDL-コレステロール測定用試薬は、現在汎用されている自動分析装置に合わせて、2試薬系にすることができる。この場合、第一試薬にアルブミン、ポリアニオン（例えば、デキストラン硫酸）、2価金属塩、非イオン性界面活性剤を含有させ、第二試薬にコレステロールエステラーゼ及びコレステロールオキシダーゼまたはコレステロールデヒドロゲナーゼを含有させる。第一試薬及び第二試薬の緩衝剤としては、リン酸緩衝液、BES、HEPES、PIPESなどのグッド緩衝液、トリス緩衝液、イミダゾール緩衝液等を使用することができる。緩衝液の濃度としては、10~1000mM、好ましくは20~500mMである。また、それらの緩衝液のpHは、5.0~9.0、好ましくはLDLのコレステロール及びVLDLのコレステロールと酵素との阻害が良好なpH6.0~8.0の範囲内で適宜選択することができる。

【0022】2試薬系の本発明試薬を用いて、HDL-コレステロールを測定する場合の反応系を模式的に示せ

50

ば以下のとおりである。

第一試薬 (アルブミン、ポリアニオン、2価金属塩、非イオン性界面活性剤)

+被検試料 (血清/血漿)

↓ LDL, VLDL と酵素の反応阻害化

第二試薬 (酵素及び発色系構成成分含有)

(コレステロールエステラーゼ反応)

コレステロールエステル +  $H_2O \rightarrow$  コレステロール + 脂肪酸 (1)

(コレステロールオキシダーゼ反応)

コレステロール +  $O_2 \rightarrow \Delta^4$ -コレステレン-3-オン +  $H_2O_2$  (2)

(ペルオキシダーゼ反応)

$H_2O_2$  + 被酸化性発色剤  $\rightarrow$  酸化縮合物 (3)

↓

吸光度測定

【0023】自動分析装置による測定では、主に前記反応式 (2) で生成する過酸化水素を比色法によって測定するが、これら溶液中での反応だけでなく、例えば、濾紙試験片などによる乾式測定系 (ドライケミストリー) でも同様に用いることができる。また、過酸化水素は、フェロシアン化カリウムなどの適当なメディエーターとペルオキシダーゼの存在下に反応させることにより、生成する酸化電位差を電気化学的に測定することもできる。他方、酵素反応により消費される物質、例えば、前記反応式 (2) で消費される酸素 (溶存酸素) を、従来公知の方法、例えば、酸素電極で測定することもできる。また、酵素反応により生成される化合物としては、前記の過酸化水素以外にも、例えば、前記反応式 (1) の生成物である脂肪酸、あるいは前記反応式 (2) の生成物である  $\Delta^4$ -コレステレン-3-オンを適当な方法で測定してもよい。

【0024】

【作用】以下の説明に限定されるものではないが、本発明においては、HDL-コレステロールの測定方法において利用する酵素 (コレステロールエステラーゼ及びコレステロールオキシダーゼまたはコレステロールデヒドロゲナーゼ) とリポドフラクシオン含有コレステロールとの反応に際して、前記従来の凝集試薬として用いる化合物が、直接にリポドフラクシオンのアポリボタンパク質に親和性を示すか、あるいは間接的にリポドフラクシオンのコレステロールと酵素との反応時に酵素と相互作用するものと考えられる。すなわち、各リポドフラクシオンは、脂質とアポリボタンパク質とからなる脂質複合体となっているが、その脂質構成比の違いとアポリボタンパク質のタイプ (A-1, A-1, B-100, B-48, C, E など) の差による物理化学的性質及び量的 (被検試料中に含まれる量) な違いによって識別される。HDLフラクシオンとLDL及びVLDLフラクシオンとの間で最も大きく異なるアポリボタンパク質のタイプ (前者がA-1, A-2、後者がB-100, C, E) の違いが明らかでないため、従来、アポリボタンパク質に対する抗体を用いる方法も開発されてきた。この従来\* 50

\* 法はアポリボタンパク質B及びCに対する抗体を試料に混和し、免疫複合体を形成させることが特徴である。この免疫複合体は酵素反応阻害を惹起するため、次に酵素を加えるとHDL-コレステロールのみが酵素と反応するので、HDL-コレステロールのみを測定することができる。しかし、免疫複合体を形成することができる抗体の反応性を一定に維持することは難しく、また免疫複合体自体の濁りが著しいため、コレステロール測定のための比色定量に際して誤差が大きくなるという欠点があった。

【0025】これに対し、本発明では、アルブミンの添加によって前記従来の凝集試薬がアポリボタンパク質を中心とする脂質複合体と相互に作用し、酵素の化学修飾等も必要とせず、コレステロールエステラーゼ及びコレステロールオキシダーゼによる、各リポドフラクシオンのコレステロールに対する反応性を特異的に変化させることができ、しかも、本発明方法は、抗体とは異なり、安定な化合物であり、さらに酵素の修飾に伴う新たな工程の増加と、酵素標品の精製度の管理や化学修飾の程度差による酵素活性変動の抑制と管理、更には修飾酵素の安定性の維持等、新たな問題点について考慮する必要がない。

【0024】

【実施例】以下、実施例によって本発明を具体的に説明するが、これらは本発明の範囲を限定するものではない。

実施例1: 超遠心法によるリポドフラクシオンの分画  
超遠心法による脂質フラクシオンの分画は、工藤明生等 (動脈硬化、6, 39, 1978) の方法に準じて行った。具体的には、ブール血清16mlへ、EDTAナトリウム塩16mg、ショ糖4g、臭化カリウム3.2g、及び塩化ナトリウム0.8gを加え溶解した。これとは別に3種類の比重液を作成した。すなわち、比重1.21の比重液は、ショ糖20g、臭化カリウム15g、及び塩化ナトリウム5gを精製水100mlに溶解して調製した。比重1.063の比重液は、比重1.21の前記比重液30mlと精製水70mlを混和して調製した。ま

11

た比重1.006の比重液は、ショ糖2.5gを精製水97.5mlに溶解して調製した。10ml容量の遠心管に上記の血清1.9mlを入れ、この上層に比重1.21の比重液0.8mlを注射器で静かに重層し、遠心管を10℃で50000rpm20時間遠心した。遠心処理終了後、最上層部には比重1.21以下の全てのリビドフラクションが集まるが、この最上層部の上に更に比重1.063の比重液1.6mlと比重1.006の比重液2mlとを重層した。この遠心管を50000rpmで4時間更に遠心し、各リビドフラクションを回収した。各画分は生理的食塩水に一夜透析後（冷蔵下）、冷蔵保存した。

#### 【0025】実施例2：反応阻害剤の検索性

表1に示す各ポリアニオンを含む水溶液0.6mlと、100mMの塩化マグネシウム、1.0%のn-OTG及び5mMのESPTを含む250mMのビスートリス緩衝液（pH7.0）0.15ml、試料として実施例1で得られたリビドフラクションのうち、HDLの20μl、LDLの10μl、VLDLの10μlを各々混合し、37℃で5分間加温した。これに0.5mMの4-AP、20μg/mlのPOD、各5u/mlのCHE（シュードモナス由来）及びCHO（ノカルディヤ由来）を含む50mMのビスートリス緩衝液（pH7.0）0.25mlを混合攪拌し、37℃で5分間反応さ\*

12

\*せた後、波長546nmにおける吸光度を測定した。また、各ポリアニオン含有水溶液にアルブミンを表2に示した濃度で添加したものを同じ同様の操作を行った。別に、ポリアニオン及びアルブミンを含まない精製水を用いて、前記と同様の操作を行い吸光度を測定した。ポリアニオン及びアルブミンを含まない時の吸光度を100として、各ポリアニオン、各ポリアニオンにアルブミンを添加したものを同様の操作を行ったときの吸光度の低下率を各脂質フラクションに対する反応阻害率として求めた。結果を表1、表2に示す。なお、各物質の略号は以下の意味である。

DS：デキストラン硫酸

ALB：血清アルブミン。

P：リンタングステン酸ナトリウム

HP：ヘパリンナトリウム

PEG：ポリエチレングリコール

n-OTG：n-オクチル-β-D-チオグルコシド

CHE：コレステロールエステラーゼ

CHO：コレステロールオキシダーゼ

POD：ペルオキシダーゼ

ESPT：N-エチル-N-スルホプロピル-m-トルイジン

#### 【0026】

##### 【表1】

ポリアニオン	濃度	HDL阻害率	LDL阻害率	VLDL阻害率
DS	0.5mM	2%	64%	31%
P	0.5mM	1%	28%	18%
HP	50U/ml	1%	35%	24%
PEG	0.5mM	0%	5%	3%

#### 【0027】

##### ※30※【表2】

ポリアニオン	濃度	アルブミン (%)	HDL阻害率	LDL阻害率	VLDL阻害率
DS	0.5mM	2%	4%	97%	98%
P	0.5mM	2%	2%	44%	64%
HP	50U/ml	2%	3%	56%	34%
PEG	0.5mM	2%	1%	9%	7%
DS	0.5mM	0.02%	2%	67%	45%
DS	0.5mM	0.1%	2%	78%	57%
DS	0.5mM	0.2%	2%	81%	68%
DS	0.5mM	1%	2%	92%	90%
DS	0.5mM	10%	5%	94%	95%
HP	0.5mM	5%	4%	65%	57%

【0028】表1、表2の結果より、HDL以外のリポ蛋白を凝集させてHDL-コレステロールを測定する反応系において、一定量以上のALBの添加によってLDL及びVLDLを十分阻害していることがわかる。特にALBとDSとの組み合わせが効果的であった。これにより、HDLフラクションのコレステロールを精度良く正確に測定することができる。

#### 【0029】実施例3：反応経時変化

0.5mMのDS、2.0%のALB、20mMの塩化★50

★マグネシウム、0.2%のn-OTG及び1mMのESPTを含む50mMのビスートリス緩衝液（pH7.0）0.75mlに、試料として、血清10μlを加え、37℃で5分間加温した。これに0.5mMの4-AP、20μg/mlのPOD、各5u/mlのCHE及びCHOを含む50mMのビスートリス緩衝液（pH7.0）0.25mlを添加し、37℃で5分間加温した後の波長546nmでの吸光度変化を測定した。血清に換えてHDL-コレステロール標準品について同様の

13

操作を行い、血清中のHDL-コレステロール値を求めた。また、ALBを除いたものを用いて同様の操作を行い対照とした。他方、同じ検体についてゲル透過カラムによる反液体クロマトグラフィー法（HPLC法、W, Marz等, Clin. Chem., 39, 2276, 1993）での測定を実施し、その測定値と比較した。また、各測定法\*

14

\*での標準物質としては、予め超遠心法で分画したHDLフラクションの総コレステロール値を酵素法で測定したものを用いた。血清10例の測定値を表3に示す。

【0030】

【表3】

検体	本法	対照法	HPLC法
血清1	38.2	60.5	37.8
血清2	41.3	58.6	40.3
血清3	36.2	75.6	36.2
血清4	16.5	30.1	17.4
血清5	29.2	42.3	28.5
血清6	21.4	58.4	23.7
血清7	32.6	75.1	32.4
血清8	27.9	31.2	26.5
血清9	70.1	109.9	68.9
血清10	43.7	46.2	41.6

単位: mg/dl

【0031】表3の通り、本発明方法は対照法と比較して、HPLC法との相関が良く、血清中のHDL-コレステロールを正確に測定することができる。

【0032】

※

※【発明の効果】試料（血清又は血漿）の遠心操作を行うことなく、簡便な操作で、HDL-コレステロールの高精度な測定を行うことができる。

フロントページの続き

(72)発明者 風早 健司

東京都千代田区東神田1丁目11番4号 株式会社ヤトロン内

(72)発明者 土屋 はずみ

東京都千代田区東神田1丁目11番4号 株式会社ヤトロン内

JP9-285298-A

THOMSON

## MACHINE-ASSISTED TRANSLATION (MAT):

(19)【発行国】

日本国特許庁 (JP)

(19)[ISSUING COUNTRY]

Japan Patent Office (JP)

(12)【公報種別】

公開特許公報 (A)

(12)[GAZETTE CATEGORY]

Laid-open Kokai Patent (A)

(11)【公開番号】

特開平 9-285298

(11)[KOKAI NUMBER]

Unexamined Japanese Patent Heisei  
9-285298

(43)【公開日】

平成9年(1997)11月4日

(43)[DATE OF FIRST PUBLICATION]

November 4, Heisei 9 (1997. 11.4)

(54)【発明の名称】

HDL-コレステロールの測定方法  
及び測定用試薬

(54)[TITLE OF THE INVENTION]

Measuring method and reagent for  
measurement of HDL-cholesterol

(51)【国際特許分類第6版】

C12Q 1/60

G01N 33/92

(51)[IPC INT. CL. 6]

C12Q 1/60

G01N 33/92

【FI】

C12Q

7823-4B

G01N 33/92

A

【FI】

1/60 C12Q 1/60

7823-4B

G01N 33/92

A

【審査請求】 未請求

[REQUEST FOR EXAMINATION] No

【請求項の数】 7

[NUMBER OF CLAIMS] 7

【出願形態】 FD

[FORM OF APPLICATION] Electronic

【全頁数】 8

[NUMBER OF PAGES] 8

**(21)【出願番号】**

特願平 8-122825

**(21)[APPLICATION NUMBER]**

Japanese Patent Application Heisei 8-122825

**(22)【出願日】**

平成8年(1996)4月22日

**(22)[DATE OF FILING]**

April 22, Heisei 8 (1996. 4.22)

**(71)【出願人】****【識別番号】**

000138277

**【氏名又は名称】**

株式会社ヤトロン

**【住所又は居所】**東京都千代田区東神田1丁目11番  
4号**(71)[PATENTEE/ASSIGNEE]****[ID CODE]**

000138277

**[NAME OR APPELLATION]**

Iatron Laboratories, Inc.

**[ADDRESS OR DOMICILE]****(72)【発明者】****【氏名】**

藤井 隆行

**【住所又は居所】**東京都千代田区東神田1丁目11番  
4号 株式会社ヤトロン内**(72)[INVENTOR]****[NAME OR APPELLATION]**

Fujii, Takayuki

**[ADDRESS OR DOMICILE]****(72)【発明者】****【氏名】**

坪田 博幸

**【住所又は居所】**東京都千代田区東神田1丁目11番  
4号 株式会社ヤトロン内**(72)[INVENTOR]****[NAME OR APPELLATION]**

Tsubota, Hiroyuki

**[ADDRESS OR DOMICILE]****(72)【発明者】****【氏名】**

濱 三知夫

**【住所又は居所】**東京都千代田区東神田1丁目11番  
4号 株式会社ヤトロン内**(72)[INVENTOR]****[NAME OR APPELLATION]**

Hama, Michio

**[ADDRESS OR DOMICILE]**

**(72)【発明者】****【氏名】**

風早 健司

**【住所又は居所】**東京都千代田区東神田1丁目11番  
4号 株式会社ヤトロン内**(72)[INVENTOR]****[NAME OR APPELLATION]**

Kazahaya, Kenji

**[ADDRESS OR DOMICILE]****(72)【発明者】****【氏名】**

土屋 ほずみ

**【住所又は居所】**東京都千代田区東神田1丁目11番  
4号 株式会社ヤトロン内**(72)[INVENTOR]****[NAME OR APPELLATION]**

Tsuchiya, Hozumi

**[ADDRESS OR DOMICILE]****(57)【要約】****【課題】**

血清または血漿試料中の高密度リポ蛋白(HDL)ーコレステロールを、遠心操作を行うことなく、簡便な操作で測定が可能な方法を提供する。

**(57)[ABSTRACT OF THE DISCLOSURE]****[SUBJECT OF THE INVENTION]**

The method whose measurement is possible in convenient operation is provided without performing centrifugation operation for high-density lipoprotein (HDL)-cholesterol in blood serum or a plasma sample.

**【解決手段】**

少なくともコレステロールエステラーゼとコレステロールオキシダーゼまたはコレステロールデヒドロゲナーゼを作用させて試料中の高密度リポ蛋白(HDL)ーコレステロールを測定する方法において、試料由来のアルブミンとは別異にアルブミンを添加・存在させて前記酵素反応を行う。

**[PROBLEM TO BE SOLVED]**

In the method of making act cholesterol esterase, cholesterol oxidase, or cholesterol dehydrogenase at least, and measuring high-density lipoprotein (HDL)- cholesterol in a sample, albumin is made to add and exist apart from albumin derived from a sample, and said enzyme reaction is performed.

**【特許請求の範囲】****[CLAIMS]****【請求項1】**

少なくともコレステロールエステラーゼとコレステロールオキシダーゼまたはコレステロールデヒドロゲナーゼを作用させて試料中の高密度リポ蛋白(HDL)－コレステロールを測定する方法において、試料由来のアルブミンとは別異にアルブミンを添加・存在させて前記酵素反応を行うことを特徴とするHDL－コレステロールの測定方法。

**[CLAIM 1]**

A measuring method of the HDL-cholesterol, in which in the method of making act cholesterol esterase, cholesterol oxidase, or cholesterol dehydrogenase at least, and measuring high-density lipoprotein (HDL)-cholesterol in a sample, albumin is made to add and exist apart from albumin derived from a sample, and said enzyme reaction is performed.

**【請求項2】**

HDLを含有する試料に、ポリアニオン、2価の金属塩、非イオン性界面活性剤、コレステロールエステラーゼ、コレステロールオキシダーゼまたはコレステロールデヒドロゲナーゼを作用させ消費される物質または生成する物質を検出し試料中のHDL－コレステロールを測定する方法において、前記反応系に試料由来のアルブミンとは別異にアルブミンを添加・存在させて前記酵素反応を行うことを特徴とする請求項1に記載のHDL－コレステロールの測定方法。

**[CLAIM 2]**

A measuring method of HDL-cholesterol of Claim 1, in which in the method of detecting the substance which effects a poly anion, bivalent metal salt, nonionic surfactant, cholesterol esterase, cholesterol oxidase, or cholesterol dehydrogenase on the sample containing HDL, and is consumed, or the substance to produce, and measuring HDL-cholesterol in a sample, albumin is made to add and exist apart from albumin derived from a sample, and said enzyme reaction is carried out to said reaction system.

**【請求項3】**

ポリアニオンが硫酸化多糖類であり、非イオン性界面活性剤がn－オクチル－ $\beta$ －グルコシド、n－オクチル－ $\beta$ －チオグルコシド、n－ヘプチル

**[CLAIM 3]**

A poly anion is a polysaccharide sulfate. The measuring method of HDL-cholesterol of Claim 2 whose nonionic surfactant is one or more type selected from n-octyl- $\beta$ -

—  $\beta$  —チオグルコシドから選択される glucoside, n-octyl- $\beta$ - thio glucoside, and  
1種以上である請求項2に記載のH n-heptyl- $\beta$ - thio glucoside.  
DL-コレステロールの測定方法。

**【請求項4】**

少なくともコレステロールエステラーゼとコレステロールオキシダーゼまたはコレステロールデヒドロゲナーゼを作用させて試料中の高密度リポ蛋白 (HDL) -コレステロールを測定するための試薬において、更にアルブミンを共存させることを特徴とするHDL-コレステロールの測定用試薬。

**[CLAIM 4]**

A reagent for a measurement of the HDL-cholesterol, in which in the reagent for making act cholesterol esterase, cholesterol oxidase, or cholesterol dehydrogenase at least, and measuring high-density lipoprotein (HDL)-cholesterol in a sample, furthermore, albumin co-exists.

**【請求項5】**

ポリアニオン、2価の金属塩、非イオン性界面活性剤、コレステロールエステラーゼ、コレステロールオキシダーゼまたはコレステロールデヒドロゲナーゼ、消費される物質又は生成する物質を検出するための組成物からなるHDL-コレステロールの測定用試薬において、更にアルブミンを共存させることを特徴とする請求項4に記載のHDL-コレステロールの測定用試薬。

**[CLAIM 5]**

A reagent for a measurement of HDL-cholesterol of Claim 4, in which in the reagent for a measurement of the HDL-cholesterol which consists of a composition for detecting a poly anion, bivalent metal salt, nonionic surfactant, cholesterol esterase, cholesterol oxidase or cholesterol dehydrogenase, the substance consumed, or the substance to produce, furthermore, albumin co-exists.

**【請求項6】**

ポリアニオン、2価の金属塩、非イオン性界面活性剤を含有する第一試薬と、少なくともコレステロールエステラーゼ、コレステロールオキシダーゼまたはコレステロールデヒドロゲナーゼを含有する第二試薬とからなり、アルブミンを第一試薬に共存させることを特徴とする請求項5に記載のHDL-コレステロールの測定用試薬。

**[CLAIM 6]**

A reagent for a measurement of HDL-cholesterol of Claim 5, which consists of the 1st reagent containing a poly anion, bivalent metal salt, and nonionic surfactant, and the 2nd reagent which contains cholesterol esterase, cholesterol oxidase, or cholesterol dehydrogenase at least. And a 1st reagent is made to coexist with albumin.

L-コレステロールの測定用試薬。

**【請求項7】**

ポリアニオンが硫酸化多糖類であり、非イオン性界面活性剤がn-オクチル-β-グルコシド、n-オクチル-β-チオグルコシド、n-ヘプチル-β-チオグルコシドから選択される1種以上である請求項5、6に記載HDL-コレステロールの測定用試薬。

**[CLAIM 7]**

A poly anion is a polysaccharide sulfate. The reagent for a measurement of HDL-cholesterol of Claim 5, 6 whose nonionic surfactant is one or more type selected from n-octyl-β- glucoside, n-octyl-β- thio glucoside, and n-heptyl-β- thio glucoside.

**【発明の詳細な説明】****[DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION]****【0001】****[0001]****【産業上の利用分野】**

本発明は高密度リポ蛋白(HDL)-コレステロールの測定方法およびHDL-コレステロールの測定用試薬に関する。

**[INDUSTRIAL APPLICATION]**

This invention is related to the reagent for a measurement of the measuring method of high-density lipoprotein (HDL)-cholesterol, and HDL-cholesterol.

**【0002】****[0002]****【従来技術】**

血漿又は血清中の各リポドフラクション中に含有されるコレステロールは、近年アテローム性動脈硬化症や心筋梗塞の危険度を示す診断材料として重要視されている。血清のリポドフラクションはそれぞれ脂質複合体粒子としての大きさが異なり、比重の差を利用した分離法である超遠心法に従って、カイロミクロン、超低密度リポ蛋白(Very low density lipoprotein; 以下VLDLともいう)、低

**[PRIOR ART]**

Importance is attached to the cholesterol contained in each lipid fraction in plasma or blood serum as a diagnostic material which shows the danger of an atherosclerosis disease or the myocardial infarction in recent years. The lipid fraction of blood serum each differs in the size as lipid composite-body particle, according to the ultracentrifugal method which is an abstraction method using the difference of specific gravity, chylomicron, very low-density lipoprotein

密度リポ蛋白質 (Low density lipoprotein ; 以下LDLともいう)、及び高密度リポ蛋白質 (High density lipoprotein; 以下HDLともいう) の4種類に分別されている。各リポドフラクションは、アポリポタンパク質と脂質に大別され、脂質は更に遊離型コレステロール、エステル型コレステロール、トリグリセリド及びリン脂質から構成されている。このため、コレステロールの測定は遊離型とエステル型の両者について行われている。

(Very low density lipoprotein; it is also mentioned Following VLDL), low-density lipoprotein (Low density lipoprotein; henceforth LDL), and high-density lipoprotein (High density lipoprotein; it is also mentioned Following HDL) these four types are classified. Each lipid fraction is divided roughly into apolipoprotein and a lipid, the lipid is further comprised from free type cholesterol, ester-type cholesterol, triglyceride, and a phosphatide. For this reason, the measurement of cholesterol is performed about both free type and ester type.

#### 【0003】

日常的な臨床検査では、自動分析装置を使用して酵素法による総コレステロールの測定が広く行われているが、HDL-コレステロールの測定については、試料の前処理(分画・分離操作)を行うことが必要なため、酵素法による自動分析測定(自動化)の普及が遅れていた。この試料の前処理としては、種々の沈殿法が行われており、例えばリンタングステン酸とマグネシウムイオン、デキストラン硫酸とマグネシウムイオン、ヘパリンとカルシウムイオンあるいはマンガンイオン (M. Burstein and H. R. Scholnick; Adv. Lipid Res., 11, 67, 1973, G.R. Warnick et al.; Clin. Chem., 25, 596, 1979)、又はポリエチレングリコールを添加してLDL等を沈殿させて遠心操作によって上澄み液を被検試料とする方法が繁用さ

#### 【0003】

In the everyday clinical laboratory test, an autoanalyzer is used and the measurement of the total cholesterol by an enzyme method is performed widely. However, about the measurement of HDL-cholesterol, since it was required to pre-process a sample (fraction/isolation operation), the propagation of the autoanalysis measurements (automation) by an enzyme method was slow. Various sedimentation is performed as pre-processing of this sample, for example, tungstophosphoric acid, a magnesium ion and a dextran sulfuric acid, a magnesium ion, a heparin and calcium ion, or a manganese ion (M. Burstein and H. R. Scholnick; Adv. Lipid Res., 11, 67, 1973, G. R. Warnick et al.; Clin. Chem., 25, 596, 1979), or the method of adding polyethyleneglycol, settling LDL etc. and making a supernatant liquid a test sample by

れている。詳細には、沈殿剤としてリ  
ンタングステン酸とマグネシウムイ  
オンを使った場合、これらを含む溶  
液に試料(血清や血漿)を加え、HD  
L以外のリポドフラクションを不溶性の  
複合体とする。これを遠心分離するこ  
とによって沈殿を除き、HDLを含む  
上清を回収する。分画されたHDLは  
総コレステロール測定用の酵素試薬  
で自動分析システムによる測定が可  
能となる。また、免疫法(C-C. Heuck,  
et al. Clin. Chem. 31, 252, 1985)に  
おいても沈殿剤としてアポリポタン  
パク質B(HDLには含まれない)に対  
する抗体を試料(血清や血漿)に加  
え、HDL以外のリポドフラクショ  
ンを沈殿させる。以下同様に分画  
した後、はじめて上清中のHDL-  
コレステロールの測定を行うことが  
できる。このように、従来の方法  
ではいずれも多くの工程と時間を  
要するという欠点があった。

**[0004]**

最近、これら分画操作を必要としない  
測定法について報告が出されている  
(例えば、特公平6-16720号、特  
公平7-34760号、特開昭58-16  
5800号各公報、国際出願番号PCT  
/JP95/00378)。すなわち、従来  
より主に用いられている総コレステ  
ロール測定のための酵素法としては、  
コレステロールエステラーゼによりコ  
レステロールエステルを加水分解し、

centrifugation operation is employed. In  
detail, when tungstophosphoric acid and a  
magnesium ion are used as a precipitant, a  
sample (a blood serum and plasma) is  
added to the solution containing these, let  
lipid fractions other than HDL be insoluble  
composite bodies. The supernatant liquid  
which contains HDL is recovered except a  
precipitate by centrifuging this. The  
measurement of fractionated HDL by an  
autoanalysis system is attained with the  
enzyme reagent for a total cholesterol  
measurement. Moreover, also in the  
immunization (C-C. Heuck, et al. Clin.  
Chem. 31, 252, 1985), the antibody with  
respect to apolipoprotein B (it does not  
contain in HDL) is added to a sample (a  
blood serum and plasma) as a precipitant,  
and lipid fractions other than HDL are  
settled. After fractionating like the following,  
HDL-cholesterol in a supernatant liquid can  
be measured for the first time. Thus, in the  
conventional method, all had the fault of  
requiring much processes and time.

**[0004]**

Recently, the report is issued about the  
measuring method which does not require  
these fractions operation (for example,  
Japanese Patent Publication No. 6-16720,  
7-34760, Unexamined-Japanese-Patent No.  
58-165800 each gazette, international  
application number PCT/JP95/00378). That  
is, as an enzyme method for the total  
cholesterol measurement mainly used  
conventionally, cholesterol ester is

この酵素反応生成物であるコレステロールをコレステロールオキシダーゼにより、溶存酸素を使って酸化反応を行わせて生成される過酸化水素を、適当な被酸化性発色剤の存在下でペルオキシダーゼ反応により発色させて比色定量したり、あるいは、前記のコレステロールオキシダーゼによる酸化反応の際に消費される溶存酸素量を酸素電極で測定する方法が知られていた。

hydrolyzed by cholesterol esterase, the hydrogen peroxide which is made oxidized using a dissolved oxygen and is produced with cholesterol oxidase in cholesterol which is this enzyme-reaction product is made to color develop by a peroxidase reaction in the presence of a suitable oxidizing coloring agent, and colorimetry is carried out, or the method of measuring the dissolved-oxygen amount consumed in the case of the oxidation reaction by said cholesterol oxidase with an oxygen electrode was learned.

**【0005】**

例えば、前記の各特許公報の記載によれば、前記の反応系において胆汁酸塩と共に非イオン系のポリエチレンオキシド基含有界面活性剤の存在はコレステロールエステラーゼの活性発現に重要であり、この界面活性剤なしには活性を発現しないとされている。そして、特公平6-16720号公報には、この胆汁酸塩には、脂質が豊富で比較的わずかなタンパク質を有するリポタンパク質である乳び脂粒、VLDL及びLDLのみを溶かし、その中に含有されるコレステロールを酵素反応に関与させる効果があるため、HDL-コレステロールの測定にさきがけて、これを反応させ、次いで前記の界面活性剤を添加し、HDLフラクション中に有されるコレステロールと酵素とを反応させることによってHDL-コレステロールを特異的に分別測定する方法が記載されている。

**[0005]**

For example, according to description of each said patent journal, in said reaction system, existence of nonionic polyethylene-oxide group -containing surface active agent is important for the active expression of cholesterol esterase with a bile salt. It is supposed without this surface active agent that activity is not expressed. And a lipid dissolves only chyle lipids, VLDL, and LDL which are lipoprotein which has abundant and comparatively slight protein in this bile salt at Japanese Patent Publication No.6-16720, since it is effective in making concerned in an enzyme reaction the cholesterol contained in it, the initiative is taken in a measurement of HDL-cholesterol, this is made to react. Subsequently, said surface active agent is added, the method of carrying out the classification measurement of the HDL-cholesterol specifically is described by making cholesterol and the

また、特公平7-34760号公報には、前記と同様の系において、更に、使用する酵素を膵臓由来のコレステロールエステラーゼとし、抗LDL抗体を反応系へ添加しておくことにより、LDLやVLDLの主要構成タンパク質であるアポリポタンパク質Bと前記抗体との間に抗原抗体反応による複合体を形成させ、当該酵素との反応を阻害することで総合的にHDLフラクションに対する特異性を上げる工夫を行っている。

**[0006]**

また、国際出願番号PCT/JP95/00378は高密度リポ蛋白(HDL)以外のリポ蛋白を凝集させる試薬の存在下、HDLを含有する試料に化学修飾されたコレステロールエステラーゼ、化学修飾されたコレステロールオキシダーゼまたは化学修飾されたコレステロールデヒドロゲナーゼを作用させ、生成する過酸化水素または還元型補酵素を定量することを特徴とするHDL中のコレステロールの定量法が記載されている。

**[0007]**

また、H. Sugiuchiらは国際出願番号PCT/JP95/00378を応用し自動分析機へ適応した新しい方法について報告している(Clin. Chem., 41, 717, 1995)。すなわち、使用する当

enzyme which it has in HDL fraction react. Moreover, in a system same as the above, in Japanese Patent Publication No.7-34760, furthermore, let the enzyme to be used be a cholesterol esterase derived from a pancreas, by adding the anti- LDL antibody to the reaction system, the composite body by an antigen antibody reaction is formed between apolipoprotein B which is main structure protein of LDL or VLDL, and said antibody. The idea which raises the specificity with respect to HDL fraction by inhibiting reaction with said enzyme synthetically is performed.

**[0006]**

Moreover, international application number PCT/JP95/00378 is the existence of a reagent which aggregates lipoprotein other than high density lipoprotein (HDL), and effects the cholesterol esterase chemically modified by the sample containing HDL, the cholesterol oxidase chemically modified, or the cholesterol dehydrogenase chemically modified. The hydrogen peroxide or reduced-type coenzyme to produce is assayed. The assay method of cholesterol in HDL characterized by the above-mentioned is described.

**[0007]**

Moreover, H. Sugiuchi and others has reported the new method which applied international application number PCT/JP95/00378 and was adapted for the autoanalyzer (Clin. Chem., 41, 717, 1995).

該酵素(コレステロールエステラーゼ、及びコレステロールオキシダーゼ)にポリエチレングリコールを結合させ、化学修飾して高分子化した酵素を用いるものである。更に、前記の高分子化酵素に加えて、種々のリポドフラクションと親和性があるとされるシクロデキストリン誘導体(具体的には、硫酸化 $\alpha$ -シクロデキストリン)を共存させることでHDL以外のリポドフラクションに対して複合体を形成させることができることが記載されている。この複合体は、前記高分子化酵素による反応を受けにくいためHDLフラクションを特異的に測定することができる。

That is, polyethyleneglycol is made to bond to said enzyme (a cholesterol esterase and cholesterol oxidase) to be used. The enzyme chemically modified and polymerized is used. Furthermore, by coexisting the cyclodextrin derivative (specifically sulfation ( $\alpha$ )-cyclodextrin) it is supposed that there exist various lipid fraction and affinity in addition to said polymerization enzyme, and is described that a composite body can be formed with respect to lipid fractions other than HDL. Since this composite body cannot receive reaction by said polymerization enzyme easily, it can measure HDL fraction specifically.

【0008】

【発明が解決しようとする課題】  
しかし、上述の従来方法では、試薬へ新たに抗体を添加したり、反応時間が20分以上かかるなど、製造コストや測定操作上、日常使われている自動分析機への対応が不十分であったり、化学修飾した酵素を利用するには、酵素の修飾という新たな工程の増加と、酵素標品の精製度の管理や化学修飾の程度差による酵素活性変動の抑制と管理、更には修飾酵素の安定性の維持等、新たな問題点を付随することになる。また、界面活性剤のみの使用による分別では不完全さが否めない。本発明者等は、現在の臨床検査試験では、迅速で簡便な手段である自動分析装置による測定が主流である点を鑑み、従来の

【0008】

【PROBLEM TO BE SOLVED BY THE INVENTION】

However, by the above-mentioned conventional method, an antibody is newly added to a reagent, reaction time takes 20 minutes or more, these etc. had the inadequate response to the autoanalyzer currently used every day on a manufacturing cost or measurement operation. The increase in the new process of a modification of an enzyme in order to utilize the enzyme chemically modified, management of the refinement degree of an enzyme preparation, and suppression and management of an enzyme active fluctuation by the grade difference of chemical modification, furthermore, new problems, such as a maintenance of stability of

HDL-コレステロールの測定方法及び測定用試薬において、試料(血清又は血漿)の遠心操作を行うことなく簡便な操作で、且つ高精度の測定結果が得られる方法の開発を目的として、鋭意研究を重ねた結果本発明を完成させた。

modification enzyme, are accompanied. Moreover, imperfection cannot be denied in classification by use of only a surface active agent. These inventors considered the present clinical-laboratory-test test in a point with a mainstream measurement by the autoanalyzer which is a rapid and convenient means, in the conventional measuring method and the conventional reagent for a measurement of HDL-cholesterol, it is convenient operation, without performing centrifugation operation of a sample (a blood serum or plasma), and this invention was completed as a result of accumulating earnest research for the purpose of development of the method by which a highly accurate measurement result is obtained.

**【0009】****【課題を解決するための手段】**

従って、本発明は、少なくともコレステロールエステラーゼ、コレステロールオキシダーゼまたはコレステロールデヒドロゲナーゼを作用させて試料中の高密度リポ蛋白(HDL)-コレステロールを測定する方法において、試料由来のアルブミンとは別異にアルブミンを添加・存在させて前記酵素反応を行うことを特徴とするHDL-コレステロールの測定方法、に関する。更に、本発明は、少なくともコレステロールエステラーゼ、コレステロールオキシダーゼまたはコレステロールデヒドロゲナーゼを作用させて試料

**[0009]****[MEANS TO SOLVE THE PROBLEM]**

Therefore, in the method of making act cholesterol esterase, cholesterol oxidase, or cholesterol dehydrogenase at least, and measuring high-density lipoprotein (HDL)-cholesterol in a sample, this invention makes albumin add and exist apart from albumin derived from a sample, and performs said enzyme reaction. It relates to the measuring method of the HDL-cholesterol characterized by the above-mentioned. Furthermore, this invention coexists albumin further in the reagent for making act cholesterol esterase, cholesterol oxidase, or cholesterol

中の高密度リポ蛋白(HDL)ーコレステロールを測定するための試薬において、更にアルブミンを共存させることを特徴とするHDLーコレステロールの測定用試薬、にも関する。以下、本発明を詳細に説明する。

dehydrogenase at least, and measuring high-density lipoprotein (HDL)-cholesterol in a sample. The reagent for a measurement of the HDL-cholesterol characterized by the above-mentioned, it relates also to these. Hereafter, this invention is demonstrated in detail.

**[0010]**

本発明の特徴は、従来のHDLーコレステロールの測定方法において、血清や血漿等の生体液試料に由来するアルブミンとは別に、人為的にアルブミンを反応系に存在させると、HDLーコレステロールの測定方法において使用する酵素(コレステロールエステラーゼ、コレステロールオキシダーゼまたはコレステロールデヒドロゲナーゼ)とリポドフラクション含有コレステロールとの反応に関して、アルブミンがHDLーコレステロールとの反応には影響しないが、LDL及びVLDLフラクションのコレステロールとの反応を阻害するという新知見を基本とする。

**[0010]**

The characteristics of this invention become like this in the measuring method of conventional HDL-cholesterol apart from albumin originating in living body liquid samples, such as blood serum and plasma. When albumin is made to exist in a reaction system artificially, it will relate to reaction of the enzyme (cholesterol esterase, the cholesterol oxidase, or cholesterol dehydrogenase) and lipid fraction-containing cholesterol which are used in the measuring method of HDL-cholesterol. Albumin does not influence reaction with HDL-cholesterol. However, it is based on the new knowledge of inhibiting reaction with cholesterol of LDL and a VLDL fraction.

**[0011]**

本発明において、試料としては、特に哺乳動物(特にヒト)の生体液であり、具体的には血清又は血漿をそのまま用いることができる。本発明においては、前記の生体試料をコレステロールエステラーゼ及びコレステロールオキシダーゼまたはコレステロールデヒドロゲナーゼと接触させる際に、試料由来のアルブミンとは別に人為

**[0011]**

In this invention, in particular as a sample, it is the living body liquid of a mammal (in particular human). Specifically blood serum or plasma can be used as it is. In this invention, when making said biological sample contact with cholesterol esterase and cholesterol oxidase, or cholesterol dehydrogenase, what is necessary is for albumin derived from a sample to be making

的にアルブミンを存在させることで、albumin exist artificially independently, and 前記酵素とLDLコレステロール及び just to react the HDL-cholesterol VLDLコレステロールとの反応を阻 measurement which concerns, after 害させた後、係るHDL-コレステロ inhibiting reaction with said enzyme, LDL ール測定の実施すれば良い。 cholesterol, and VLDL cholesterol.

**【0012】**

以下の記述において、「HDL以外のリポ蛋白を凝集させる」とは、HDL以外のリポ蛋白と凝集試薬が会合状態を呈し、該リポ蛋白と酵素との反応が阻害される状態をいう。HDL以外のリポ蛋白を凝集させてHDL-コレステロールを測定する反応系、具体的には、HDL以外のリポ蛋白であるLDL、VLDLおよびカイロミクロンを凝集させる凝集試薬、すなわちポリアニオンと2価の金属塩からなる凝集試薬、具体的には、デキストラン硫酸またはその塩、ポリエチレングリコール、ヘパリンまたはその塩、リンタングステン酸またはその塩もしくはこれらの組み合わせ及び2価の金属塩からなる公知の凝集試薬を用いるHDL-コレステロールの測定に本発明方法を適用する場合、試料とコレステロールエステラーゼ及びコレステロールオキシダーゼまたはコレステロールデヒドロゲナーゼと接触させる際に、アルブミンを共存させておく。あるいは、試料とコレステロールエステラーゼ及びコレステロールオキシダーゼまたはコレステロールデヒドロゲナーゼと接触させる際、予めアルブミンを共存させておき、LDL及びVLDLフラクションのコレステロールとの反応

**【0012】**

In the following descriptions, lipoprotein and the aggregation reagents other than HDL exhibit a meeting state, and, as for "aggregating lipoprotein other than HDL", the state by which reaction of this lipoprotein and enzyme is inhibited is said. The reaction system which is made to aggregate lipoprotein other than HDL and measures HDL-cholesterol, the aggregation reagent which specifically aggregates LDL, VLDL, and the chylomicron which are lipoprotein other than HDL, namely, the aggregation reagent which consists of a poly anion and bivalent metal salt, when applying a method of this invention to a measurement of HDL-cholesterol using the well-known aggregation reagent which consists of a dextran sulfuric acid or its salt, polyethyleneglycol, a heparin or its salt, tungstophosphoric acid, its salt or such combination, and bivalent metal salt specifically, albumin is coexisted when making it contact with a sample, cholesterol esterase and cholesterol oxidase, or cholesterol dehydrogenase. Or when making it contact with a sample, cholesterol esterase and cholesterol oxidase, or cholesterol dehydrogenase, albumin is coexisted beforehand and reaction with cholesterol of

を阻害し、LDL及びVLDLフラクションの反応を完全に停止することが可能となり、精度良くHDLフラクションのコレステロールだけを選択的に測定することができる。

LDL and a VLDL fraction is inhibited, it becomes possible to stop reaction of LDL and a VLDL fraction completely, only cholesterol which is HDL fraction accurately can be measured alternatively.

**【0013】**

アルブミンは、本来血清（血漿）にも含まれているため、本反応系には試料由来のアルブミンが微量存在する。しかし、HDL以外のリポ蛋白とコレステロールエステラーゼ及びコレステロールオキシダーゼまたはコレステロールデヒドロゲナーゼの反応を阻害するためには、試料由来のアルブミンでは不十分であることは以下の実施例で確認されている。反応系におけるアルブミン量は、0.01～20.0重量%、好ましくは0.1～20.0重量%、より好ましくは0.5～10.0重量%のアルブミンを存在させておくことが必須であり、この範囲内にコントロールするために試料由来のアルブミンとは別異にアルブミンを添加することが必要となる。

**[0013]**

Since albumin is contained also in the original blood serum (plasma), albumin derived from a sample carries out trace amount existence of it at this reaction system. However, in order to inhibit reaction of lipoprotein other than HDL, cholesterol esterase and cholesterol oxidase, or cholesterol dehydrogenase, it is confirmed in the following Examples that albumin derived from a sample is inadequate. The albumin amount in a reaction system is 0.01 to 20.0 weight%, preferably it is 0.1 to 20.0 weight%, it is essential to, make 0.5 to 10.0 weight% of albumin exist more preferably. In order to control within the range of this, it is necessary to add albumin apart from albumin derived from a sample.

**【0014】**

HDL以外のリポ蛋白を凝集させてHDL-コレステロールを測定する反応系の場合、遠心分離等の操作を行わずに、アルブミン、ポリアニオン、2価の金属塩、非イオン性界面活性剤と試料を接触させることにより、被検試料中のLDL-コレステロール及びVLDL-コレステロールと酵素とは反応しないが、HDL-コレステロールと

**[0014]**

In the case of the reaction system which is made to aggregate lipoprotein other than HDL and measures HDL-cholesterol, a centrifugation etc. is not effected, LDL-cholesterol and VLDL-cholesterol, and the enzyme in a test sample do not react by making albumin, a poly anion, bivalent metal salt, nonionic surfactant, and a sample contact. However, it comes to react with

酵素と反応するようになる。次いでコレステロールエステラーゼ、コレステロールオキシダーゼまたはコレステロールデヒドロゲナーゼを作用させ、HDL-コレステロールのみと前記各酵素との酵素反応により消費される物質(例えば、補酵素)又は生成される物質(例えば、過酸化水素)を、公知の手段により検出し、HDL-コレステロールを定量することができる。例えば、過酸化水素を検出する場合には、適当な被酸化性発色剤とペルオキシダーゼの存在下に生成する過酸化水素を発色させて、分光学的に比色測定すれば良い。また、コレステロールデヒドロゲナーゼを用いる場合、NAD(P)から生成するNAD(P)Hを例えば波長340nmで分光学的にモニターすることで検出することができる。

#### [0015]

過酸化水素は、公知の方法で、例えば、適当な被酸化性発色剤の存在下にペルオキシダーゼの反応により発色させることができる。被酸化性発色剤としては、3-ハイドロキシー-2,4,6-トリヨードベンゾイックアシド(HTIBA)やN-エチル-N-スルホプロピル-m-トルイジン(ESPT)と4-アミノアンチピリン(4-AP)が好適であり、自動分析装置による測定では、波長510nm(HTIBAを使用する場合)付近、又は546nm(ESPTを使用する場合)付近における吸光

HDL-cholesterol and an enzyme. Subsequently, cholesterol esterase, cholesterol oxidase, or cholesterol dehydrogenase is made to effect. The substance (for example, coenzyme) consumed by the enzyme reaction of HDL-cholesterol and each said enzyme or the substance (for example, hydrogen peroxide) produced is detected by a well-known means, HDL-cholesterol can be assayed. For example, when detecting a hydrogen peroxide, the hydrogen peroxide produced in the presence of a suitable oxidizing coloring agent and peroxidase is made to color develop. What is sufficient is just to carry out a colorimetry measurement in spectroscopy. Moreover, when using cholesterol dehydrogenase, NAD(P)H produced from NAD(P) can be detected by monitoring in spectroscopy with wavelength 340 nm.

#### [0015]

A hydrogen peroxide is a well-known method and, for example, can be made to color develop by reaction of peroxidase in the presence of a suitable oxidizing coloring agent. As an oxidizing coloring agent, 3-hydroxy -2,4,6-tri iodo benzoic acid (HTIBA), N- ethyl -N- sulfo propyl-m- toluidine (ESPT), and 4-amino antipyrine (4-AP) are suitable. What is sufficient is just to measure the light absorbency in wavelength 510 nm (when using HTIBA) vicinity or 546 nm (when using ESPT) vicinity in the measurement by an autoanalyzer.

度を測定すればよい。

**[0016]**

次に、従来のHDL-コレステロール測定用試薬にアルブミンを共存させた試薬について説明する。原則としてコレステロールエステラーゼ、コレステロールオキシダーゼまたはコレステロールデヒドロゲナーゼを作用させてHDL-コレステロールを測定する試薬であれば本発明は適用可能である。具体的には、例えばHDL以外のリポ蛋白を凝集させてHDL-コレステロールを測定する試薬においては、HDL以外のリポ蛋白を凝集させる凝集試薬、すなわちポリアニオンと2価の金属塩からなる凝集試薬、具体的には、デキストラン硫酸またはその塩、ポリエチレングリコール、ヘパリンまたはその塩、リンタングステン酸またはその塩もしくはこれらの組み合わせ及び2価の金属塩からなる凝集試薬、更に非イオン性界面活性剤、コレステロールエステラーゼ、コレステロールオキシダーゼまたはコレステロールデヒドロゲナーゼ、酵素反応によって消費される物質(例えば、補酵素)又は生成される物質(例えば、過酸化水素)を検出するための組成物に、アルブミンを存在させたものであれば良い。

**[0017]**

アルブミンとしては、反応系に0.01～20.0重量%、好ましくは0.1～20.0重量%、より好ましくは0.5～1

**[0016]**

Next, the reagent which made the conventional reagent for a HDL-cholesterol measurement coexist with albumin is demonstrated. In principle, this invention can be applied if it is the reagent which effects cholesterol esterase, cholesterol oxidase, or cholesterol dehydrogenase, and measures HDL-cholesterol. The aggregation reagent which aggregates lipoprotein other than HDL in the reagent which is made to aggregate lipoprotein other than HDL for example, and specifically measures HDL-cholesterol, i.e., the aggregation reagent which consists of a poly anion and bivalent metal salt, the aggregation reagent which specifically consists of a dextran sulfuric acid or its salt, polyethyleneglycol, a heparin or its salt, tungstophosphoric acid, its salt or such combination, and bivalent metal salt, furthermore, what is sufficient is just to make albumin exist in the composition for detecting the substance (for example, coenzyme) consumed by nonionic surfactant, the cholesterol esterase, the cholesterol oxidase or the cholesterol dehydrogenase, and an enzyme reaction, or the substance (for example, hydrogen peroxide) produced.

**[0017]**

As albumin, it is 0.01 to 20.0 weight% to a reaction system, preferably it is 0.1 to 20.0 weight%, it is made to contain in a reagent

0.0重量%となるように試薬中に含有させる。アルブミン濃度が0.01重量%より少ないと阻害効果が不十分であり、10.0重量%を越えると試薬の粘度が高くなり、測定の再現性の悪化を招くという問題点が生じる。また、アルブミンの由来は特に限定されず、ヒト、ウシ、ヒツジ、ウマ等の哺乳動物由来のほか遺伝子工学的に産生されたものでも使用できる。上記試薬の場合、アルブミンと併用するポリアニオンとしては、硫酸化多糖類が好ましく、特にデキストラン硫酸がHDL以外のリポ蛋白と酵素との反応を効果的に阻害するため、デキストラン硫酸を使用することが好ましい。デキストラン硫酸としては、反応系に $1\mu\text{M}$ ～ $500\mu\text{M}$ 、好ましくは $5.0\mu\text{M}$ ～ $100\mu\text{M}$ の分子量10000～500000のデキストラン硫酸またはその塩、あるいは $10\mu\text{M}$ ～ $5\text{mM}$ 、好ましくは $50\mu\text{M}$ ～ $1\text{mM}$ の分子量1000～10000のデキストラン硫酸またはその塩となるように試薬中に含有させる。デキストラン硫酸濃度が下限より少ないと阻害効果が不十分であり、上限を越えると酵素の阻害による反応性低下という問題点が生じる。2価の金属塩としてはマグネシウム塩、カルシウム塩、マンガン塩であり、塩としては、水溶性無機塩、例えば、ハロゲン化物（例えば、塩化物、臭化物、又はヨウ化物）又は硫酸化物、あるいは、水溶性有機塩、例えば、酢酸塩又はクエン酸塩として用いることができる。2価の金属としては、反応系に1～100m

so that it may become 0.5 to 10.0 weight% more preferably. An inhibitory effect is inadequate when there are few albumin concentrations than 0.01 weight%. When 10.0 weight% is exceeded, the viscosity of a reagent will become higher, the problem of causing a deterioration of the reproducibility of a measurement arises. Moreover, the origin of albumin is not specifically limited but can also use the thing produced by genetic engineering besides mammal origin, such as a human, a cow, a sheep, and a horse. In the case of said reagent, as a poly anion used together with albumin, a polysaccharide sulfate is preferable, and in order that in particular a dextran sulfuric acid may inhibit reaction of lipoprotein other than HDL, and an enzyme effectively, it is preferable to use a dextran sulfuric acid. As a dextran sulfuric acid, it is 1 micronM to 500 micronM in a reaction system, preferably they are the dextran sulfuric acid of the molecular weight 10000-500000 of 5.0 micronM to 100 micronM, its salt, or 10 micronM to 5 mM, and is made to contain in a reagent so that it may preferably become the dextran sulfuric acid of the 50 micronM to 1 mM molecular weight 1000-10000, or its salt. When there are dextran sulfuric-acid concentrations lower than a minimum, an inhibitory effect is inadequate. When an upper limit is exceeded, the problem of the reactive reduction by inhibition of an enzyme will arise. As bivalent metal salt, they are magnesium salt, a calcium salt, and manganese salt. As a salt, it can use as

M、好ましくは5～50mMの濃度となるように試薬中に含有させる。2価の金属塩の濃度が下限より少ないと阻害効果が不十分であり、上限を越えると保存による金属の塩析や酵素の阻害による反応性低下という問題点が生じる。

water-soluble mineral salt (for example, chloride, bromide, or iodide), for example, a halide, sulfate, a water-soluble organic salt, for example, acetate, or a citrate. As bivalent metal, it is 1 to 100 mM to a reaction system, it is made to contain in a reagent so that it may preferably become the concentration of 5 to 50 mM. When there are concentrations of bivalent metal salt lower than a minimum, an inhibitory effect is inadequate. When an upper limit is exceeded, the problem of the reactive reduction by inhibition of the curing salting of the metal by preservation or an enzyme will arise.

#### [0018]

非イオン性界面活性剤としては、公知の非イオン性界面活性剤全般を使用することができるが、上記試薬の場合、アルブミンと併用する非イオン性界面活性剤としては特にn-オクチル-β-グルコシド、n-オクチル-β-チオグルコシド、n-ヘプチル-β-チオグルコシドがHDL以外のリポ蛋白と酵素との反応を好適に阻害するため、これらから選択される1種以上のものを使用することが好ましい。その反応系における濃度がn-オクチル-β-グルコシドの場合、0.01～2.0%、好ましくは0.1～1.0%となるように試薬中に含ませる。n-オクチル-β-チオグルコシドの場合、0.01～1.0%、好ましくは0.05～0.5%で用いる。n-ヘプチル-β-チオグルコシドの場合、0.01～2.0%、好ましくは0.1～

#### [0018]

As nonionic surfactant, a well-known nonionic surfactant at large can be used. However, in the case of said reagent, as nonionic surfactant used together with albumin, in order that n-octyl-β-glucoside, n-octyl-β-thio glucoside, and n-heptyl-β-thio glucoside may, in particular, inhibit reaction of lipoprotein other than HDL, and an enzyme suitably, it is preferable to use the one or more type of thing selected from these. When the concentration in the reaction system is n-octyl-β-glucoside, it is 0.01 to 2.0 %, it is made to contain into a reagent so that it may preferably become 0.1 to 1.0 %. In the case of n-octyl-β-thio glucoside, it is 0.01 to 1.0 %, preferably it uses at 0.05 to 0.5 %. In the case of n-heptyl-β-thio glucoside, it is 0.01 to 2.0 %, preferably it uses at 0.1 to 1.0 %. Or it is sufficient to mix and use these by said

1. 0%で用いる。あるいは、これらを前記濃度範囲内で混合して使用しても良い。前記非イオン性界面活性剤の濃度が下限より少ないと酵素との反応が不十分となり、上限を越えるとHDL-コレステロールに対する阻害効果が低下するという問題点が生じる。

**[0019]**

コレステロールエステラーゼ及びコレステロールオキシダーゼ等の酵素としては、ポリエチレングリコール (PEG) 等を結合させて化学修飾した酵素、又は化学修飾していない酵素のいずれも用いることができる。酵素の由来も限定されず、コレステロールエステラーゼとしては、例えば、シュードモナス属の微生物や、牛又は豚の膵臓由来のコレステロールエステラーゼを用いることができる。また、コレステロールオキシダーゼとしては、例えば、ストレプトマイセス属又はノカルディヤ属の微生物由来のコレステロールオキシダーゼを用いることができる。コレステロールデヒドロゲナーゼについても同様であり、例えば、微生物由来のものを使用することができる。それらの酵素の添加量も特に限定されないが、例えば、0.1 u/ml ~ 20 u/ml、より好ましくは0.2 u/ml ~ 10 u/mlである。

**[0020]**

コレステロールエステラーゼ、コレステロールオキシダーゼまたはコレステ

concentration within the limits. When there are few concentrations of said nonionic surfactant than a minimum, reacting with an enzyme will become inadequate, when an upper limit is exceeded, the problem that the inhibitory effect with respect to HDL-cholesterol reduces will arise.

**[0019]**

Either the enzyme which polyethyleneglycol (PEG) etc. was made to bond and was chemically modified as enzymes, such as cholesterol esterase and cholesterol oxidase, or the enzyme which is not chemically modified can be used. The origin of an enzyme is not limited, either but the cholesterol esterase derived from the microorganisms of a Pseudomonas genus and the pancreas of a cow or a pig can be used as cholesterol esterase, for example. Moreover, as cholesterol oxidase, the cholesterol oxidase of microorganism-derived of a Streptomyces genus or a Nocardia genus can be used, for example. The same may be said of cholesterol dehydrogenase. For example, microorganism-derived thing can be used. Although the additional amount of those enzymes is not specifically limited either, it is 0.1 u/ml - 20 u/ml, for example, more preferably, it is 0.2 u/ml - 10 u/ml.

**[0020]**

Cholesterol esterase, cholesterol oxidase, or cholesterol dehydrogenase is made to effect.

ロールデヒドロゲナーゼを作用させ、HDL-コレステロールのみと前記各酵素との酵素反応により消費される物質(例えば、補酵素)又は生成される物質(例えば、過酸化水素)を検出するには、公知の組成物を用いれば良い。例えば、過酸化水素を検出する場合には、適当な被酸化性発色剤とペルオキシダーゼの存在下に生成する過酸化水素を発色させて、分光学的に比色測定ができ、例えば、適当な被酸化性発色剤の存在下にペルオキシダーゼの反応により発色させることができる。被酸化性発色剤としては、3-ハイドロキシ-2, 4, 6-トリヨードベンゾイックアシド(HTIBA)やN-エチル-N-スルホプロピル-m-トルイジン(ESPT)と4-アミノアンチピリン(4-AP)が好適であり、HTIBAやESPTは0.1mM~5mMの濃度範囲で、そして4-APは0.05mM~2mMの濃度範囲で適宜含有させることができる。

#### [0021]

本発明のHDL-コレステロール測定用試薬は、現在汎用されている自動分析装置に合わせて、2試薬系にすることができる。この場合、第一試薬にアルブミン、ポリアニオン(例えば、デキストラン硫酸)、2価金属塩、非イオン性界面活性剤を含有させ、第二試薬にコレステロールエステラーゼ及びコレステロールオキシダーゼまたはコレステロールデヒドロゲナーゼを含有させる。第一試薬及び第二試

What is sufficient is just to use a well-known composition, in order to detect the substance (for example, coenzyme) consumed by the enzyme reaction of HDL-cholesterol and each said enzyme, or the substance (for example, hydrogen peroxide) produced. For example, when detecting a hydrogen peroxide, the hydrogen peroxide produced in the presence of a suitable oxidizing coloring agent and peroxidase is made to color develop. A colorimetry measurement can be performed in spectroscopy, for example, it can be made to color develop by reaction of peroxidase in the presence of a suitable oxidizing coloring agent. As an oxidizing coloring agent, 3-hydroxy -2,4,6-tri iodo benzoic acid (HTIBA), N-ethyl -N- sulfo propyl-m- toluidine (ESPT), and 4-amino antipyrine (4-AP) are suitable. The concentration range of HTIBA or ESPT is 0.1 mM - 5 mM, and 4-AP can be suitably contained in the range with a concentration of 0.05 mM - 2 mM.

#### [0021]

The reagent for a HDL-cholesterol measurement of this invention can be made into two reagent systems according to the autoanalyzer used widely now. In this case, a 1st reagent is made to contain albumin, a poly anion (for example, dextran sulfuric acid), bivalent metal salt, and nonionic surfactant. A 2nd reagent is made to contain cholesterol esterase and cholesterol oxidase, or cholesterol dehydrogenase. As a buffer of a 1st reagent and a 2nd reagent,

薬の緩衝剤としては、リン酸緩衝液、BES、HEPES、PIPESなどのグッド緩衝液、トリス緩衝液、イミダゾール緩衝液等を使用することができる。緩衝液の濃度としては、10～1000mM、好ましくは20～500mMである。また、それらの緩衝液のpHは、5.0～9.0、好ましくはLDLのコレステロール及びVLDLのコレステロールと酵素との阻害が良好なpH6.0～8.0の範囲内で適宜選択することができる。

phosphate buffer, BES, HEPES, and PIPES etc. good buffer, a tris buffers, imidazole buffer, etc. can be used. As a concentration of buffer, it is 10 to 1000 mM, preferably it is 20 to 500 mM. Moreover, pH of those buffer is 5.0-9.0, preferably inhibition with cholesterol of LDL and cholesterol of VLDL, and an enzyme can select suitably within the range of favorable pH6.0-8.0.

#### 【0022】

2試薬系の本発明試薬を用いて、HDL-コレステロールを測定する場合の反応系を模式的に示せば以下のとおりである。

第一試薬(アルブミン、ポリアニオン、2価金属塩、非イオン性界面活性剤)  
+被検試料(血清/血漿)  
↓ LDL, VLDLと酵素の  
反応阻害化

第二試薬(酵素及び発色系構成成分含有)

(コレステロールエステラーゼ反応)

コレステロールエステル + H<sub>2</sub>O →  
コレステロール + 脂肪酸 (1)

(コレステロールオキシダーゼ反応)

コレステロール + O<sub>2</sub> → Δ<sup>4</sup>-コレステレン-3-オン + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (2)  
(ペルオキシダーゼ反応)

#### 【0022】

It will be as follows if the reaction system in the case of measuring HDL-cholesterol is typically shown using this-invention reagent of two reagent systems.

1st reagent (albumin, a poly anion, bivalent metal salt, nonionic surfactant)  
+Test sample (a blood serum/plasma)  
↓ Formation of reaction inhibition of LDL, VLDL, and an enzyme

2nd reagent (an enzyme and color-development system structural component containing)

(Cholesterol esterase reaction)

Cholesterol ester + H<sub>2</sub>O → cholesterol + fatty acid (1)

(Cholesterol oxidase reaction)

Cholesterol + O<sub>2</sub> → Δ<sup>4</sup>-cholesten-3-on + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (2)  
(Peroxidase reaction)

$\text{H}_2\text{O}_2 + \text{被酸化性発色剤} \rightarrow \text{酸化縮合物}$   
(3)

↓

吸光度測定

$\text{H}_2\text{O}_2 + \text{oxidizing coloring agent} \rightarrow \text{oxidation condensate}$   
(3)

↓

Light-absorbency measurement

## 【0023】

自動分析装置による測定では、主に前記反応式(2)で生成する過酸化水素を比色法によって測定するが、これら溶液中での反応だけでなく、例えば、濾紙試験片などによる乾式測定系(ドライケミストリー)でも同様に用いることができる。また、過酸化水素は、フェロシアン化カリウムなどの適当なメディエーターとペルオキシダーゼの存在下に反応させることにより、生成する酸化電位差を電気化学的に測定することもできる。他方、酵素反応により消費される物質、例えば、前記反応式(2)で消費される酸素(溶存酸素)を、従来公知の方法、例えば、酸素電極で測定することもできる。また、酵素反応により生成される化合物としては、前記の過酸化水素以外にも、例えば、前記反応式(1)の生成物である脂肪酸、あるいは前記反応式(2)の生成物である $\Delta^4$ -コレステレン-3-オンを適当な方法で測定してもよい。

## 【0023】

In the measurement by an autoanalyzer, the hydrogen peroxide mainly produced by said Reaction formula (2) is measured with a colorimetric method. However, it can use similarly not only by reaction in these solutions but by the dry-type system of measurement (dry chemistry) according to a filter-paper-test piece etc. for example. Moreover, a hydrogen peroxide can also measure the oxidation-potential difference to produce electrochemically by making it react in the presence of a suitable mediator and peroxidase, such as a potassium ferrocyanide. On the other hand, the substance consumed by an enzyme reaction, for example, the oxygen consumed by said Reaction formula (2), (dissolved oxygen) can also be measured by the conventionally well-known method, for example, an oxygen electrode. Moreover, as a compound produced by the enzyme reaction, it is sufficient to measure the fatty acid which is the product of said Reaction formula (1), or 4-cholesten-3-on which is the product of said Reaction formula (2)  $\Delta$  by a suitable method, for example besides said hydrogen peroxide.

【0024】

## 【作用】

以下の説明に限定されるものではないが、本発明においては、HDL-コレステロールの測定方法において利用する酵素(コレステロールエステラーゼ及びコレステロールオキシダーゼまたはコレステロールデヒドロゲナーゼ)とリポドフラクション含有コレステロールとの反応に際して、前記従来の凝集試薬として用いる化合物が、直接にリポドフラクションのアポリポタンパク質に親和性を示すか、あるいは間接的にリポドフラクションのコレステロールと酵素との反応時に酵素と相互作用するものと考えられる。すなわち、各リポドフラクションは、脂質とアポリポタンパク質とからなる脂質複合体となっているが、その脂質構成比の違いとアポリポタンパク質のタイプ(A-1, A-2, B-100, B-48, C, Eなど)の差による物理化学的性質及び量的(被検試料中に含まれる量)な違いによって識別される。HDLフラクションとLDL及びVLDLフラクションとの間で最も大きく異なるアポリポタンパク質のタイプ(前者がA-1, A-2、後者がB-100, C, E)の違いが明らかたため、従来、アポリポタンパク質に対する抗体を用いる方法も開発されてきた。この従来法はアポリポタンパク質B及びCに対する抗体を試料に混和し、免疫複合体

[0024]

## [OPERATION]

It is not limited to the following description. However, in this invention, the compound used as said conventional aggregation reagent shows affinity to the apolipoprotein of a lipid fraction directly in the case of reaction with the enzyme (the cholesterol esterase and the cholesterol oxidase, or cholesterol dehydrogenase) and lipid fraction -containing cholesterol which are utilized in the measuring method of HDL-cholesterol, or it is indirectly considered the thing which interacts with an enzyme at the time of reaction of cholesterol of a lipid fraction, and an enzyme. That is, each lipid fraction serves as a lipid composite body which consists of a lipid and apolipoprotein. However, physicochemical character and the quantitative (amount contained into a test sample) difference by a difference of the difference of the lipid percentage and the type (A-1, A-2, B-100, B-48, C, E etc.) of apolipoprotein are identified. Since the difference of the type (A-1, A-2, and the latter are B-100, and C and E in the former) of apolipoprotein different most greatly between HDL fraction, LDL, and a VLDL fraction is clear, the method of using the antibody with respect to apolipoprotein has also been developed conventionally. This conventional method mixes with the antibody with respect to apolipoprotein B and C at a

を形成させることが特徴である。この免疫複合体は酵素反応阻害を惹起するため、次に酵素を加えるとHDL-コレステロールのみが酵素と反応するので、HDL-コレステロールのみを測定することができる。しかし、免疫複合体を形成することができる抗体の反応性を一定に維持することは難しく、また免疫複合体自体の濁りが著しいため、コレステロール測定のための比色定量に際して誤差が大きくなるという欠点があった。

**[0025]**

これに対し、本発明では、アルブミンの添加によって前記従来の凝集試薬がアポリポタンパク質を中心とする脂質複合体と相互に作用し、酵素の化学修飾等も必要とせず、コレステロールエステラーゼ及びコレステロールオキシダーゼによる、各リピドフラクションのコレステロールに対する反応性を特異的に変化させることができ、しかも、本発明方法は、抗体とは異なり、安定な化合物であり、さらに酵素の修飾に伴う新たな工程の増加と、酵素標品の精製度の管理や化学修飾の程度差による酵素活性変動の抑制と管理、更には修飾酵素の安定性の維持等、新たな問題点について考慮する必要がない。

sample, it is the characteristics to form an immune complex. In order that this immune complex may induce enzyme-reaction inhibition, when an enzyme is added next, only HDL-cholesterol will react with an enzyme, therefore only HDL-cholesterol can be measured. However, it is difficult to maintain uniformly the reactivity of the antibody which can form an immune complex, moreover, since muddiness of immune-complex itself was remarkable, when it was the colorimetry for cholesterol measurement, there existed a fault that a error became larger.

**[0025]**

By this invention, by the addition of albumin to this, the said conventional aggregation reagent effects mutually with the composite body of the lipid which centers on apolipoprotein, chemical modification of an enzyme etc. is not required, the reactivity with respect to cholesterol of each lipid fraction by the cholesterol esterase and cholesterol oxidase can be changed specifically, and a method of this invention differs from an antibody, it is a stable compound, furthermore, it is not necessary to consider about new problems, such as an increase in the new process which accompanies a modification of an enzyme, management of the refinement degree of an enzyme preparation, suppression of the enzyme active fluctuation by the grade difference of chemical modification and management, and also a maintenance of

stability of modification enzyme.

【0024】

【実施例】

以下、実施例によって本発明を具体的に説明するが、これらは本発明の範囲を限定するものではない。

実施例1:超遠心法によるリポドフラクションの分画

超遠心法による脂質フラクションの分画は、工藤明生等(動脈硬化、6, 39, 1978)の方法に準じて行った。具体的には、プール血清16mlへ、EDT Aナトリウム塩16mg、ショ糖4g、臭化カリウム3.2g、及び塩化ナトリウム0.8gを加え溶解した。これとは別に3種類の比重液を作成した。すなわち、比重1.21の比重液は、ショ糖20g、臭化カリウム15g、及び塩化ナトリウム5gを精製水100mlに溶解して調製した。比重1.063の比重液は、比重1.21の前記比重液30mlと精製水70mlを混和して調製した。また比重1.006の比重液は、ショ糖2.5gを精製水97.5mlに溶解して調製した。10ml容量の遠心管に上記の血清1.9mlを入れ、この上層に比重1.21の比重液0.8mlを注射器で静かに重層し、遠心管を10℃で50000rpm20時間遠心した。遠心処理終了後、最上層部には比重1.21以下の全てのリポドフラクションが集まるが、この最上層部の上に更に比重1.063の比重液1.6mlと比重1.006の比重液2mlとを重層した。この遠

【0024】

[EXAMPLES]

Hereafter, an Example demonstrates this invention concretely. These do not limit the range of this invention.

Example 1: Fraction of the lipid fraction by a ultracentrifugal method

The fraction of the lipid fraction by a ultracentrifugal method was performed according to KUDO Akio et al. (Arteriosclerosis, 6, 39, 1978) etc. method. Specifically, 16 mg of EDTA sodium salts, 4g of sucrose, 3.2g of potassium bromide, and 0.8g of sodium chloride were added and dissolved to 16 ml of pooled serum. The ratio heavy liquid of a 3 type was produced apart from this. That is, the ratio heavy liquid of specific gravity 1.21 dissolved 20g of sucrose, 15g of potassium bromide, and 5g of sodium chloride in 100 ml of purified waters, and prepared it. It mixed with 30 ml of said ratio heavy liquids and 70 ml of purified waters of specific gravity 1.21, and the ratio heavy liquid of specific gravity 1.063 prepared them. Moreover, the ratio heavy liquid of specific gravity 1.006 dissolved 2.5g of sucrose in 97.5 ml of purified waters, and prepared them. 1.9 ml of said blood serum is put into the centrifuge tube of 10 ml volume, besides, 0.8 ml of ratio heavy liquids of specific gravity 1.21 is calmly stratified with a syringe in a layer, 50000 rpm of centrifuge tubes was centrifuged at 10 degrees C for 20

心管を50000rpmで4時間更に遠心し、各リポドフラクションを回収した。各画分は生理的食塩水に一夜透析後(冷蔵下)、冷蔵保存した。

hours. All with a specific gravity of 1.21 or less lipid fractions gather for the uppermost layer part after the centrifugation processing completion. However, 1.6 ml of ratio heavy liquids of specific gravity 1.063 and 2 ml of ratio heavy liquids of specific gravity 1.006 were further stratified on this uppermost layer part. This centrifuge tube is further centrifuged by 50000 rpm for 4 hours, each lipid fraction was recovered. Each fraction was cool preserved after the overnight dialysis (under refrigeration) to the physiological sodium chloride solution.

#### 【0025】

##### 実施例2:反応阻害剤の検索例

表1に示す各ポリアニオンを含む水溶液0.6mlと、100mMの塩化マグネシウム、1.0%のn-OTG及び5mMのESPTを含む250mMのビスートリス緩衝液(pH7.0)0.15ml、試料として実施例1で得られたリポドフラクションのうち、HDLの20 $\mu$ l、LDLの10 $\mu$ l、VLDLの10 $\mu$ lを各々混合し、37℃で5分間加温した。これに0.5mMの4-AP、20 $\mu$ g/mlのPOD、各5u/mlのCHE(シュードモナス由来)及びCHO(ノカルディヤ由来)を含む50mMのビスートリス緩衝液(pH7.0)0.25mlを混合攪拌し、37℃で5分間反応させた後、波長546nmにおける吸光度を測定した。また、各ポリアニオン含有水溶液にアルブミンを表2に示した濃度で添加したものをを用い同様の操作を行った。別に、ポリアニオン及びアルブミ

#### 【0025】

##### Example 2: Example of a search of the reaction inhibitor

20 microliter of HDL, 10 microliter of LDL, and 10 microliter of VLDL of 0.15 ml (pH7.0) of 250 mM bis-tris buffers which contain 0.6 ml of aqueous solution which contains each poly anion shown to Table 1, magnesium chloride of 100 mM, 1.0% of n-OTG, and 5 mM ESPT, and the lipid fraction obtained in Example 1 as a sample are mixed respectively, it heated for 5 minutes at 37 degrees C. 0.25 ml (pH7.0) of 50 mM bis-tris buffers which contain each POD of 0.5 mM 4-AP and 20 microgram/ml, and 5 u/ml CHE (Pseudomonas origin) and CHO (Nocardia origin) in this is mix and stirred, after making it react for 5 minutes at 37 degrees C, the light absorbency in wavelength 546 nm was measured. Moreover, the same operation was performed using what added albumin to each poly anion -containing aqueous

ンを含まない精製水を用いて、前記と同様の操作を行い吸光度を測定した。ポリアニオン及びアルブミンを含まない時の吸光度を100として、各ポリアニオン、各ポリアニオンにアルブミンを添加したものをを用いたときの吸光度の低下率を各脂質フラクションに対する反応阻害率として求めた。結果を表1、表2に示す。なお、各物質の略号は以下の意味である。

solution by the concentration shown in Table 2. Independently, using the purified water which does not contain a poly anion and albumin, operation same as the above was performed and the light absorbency was measured. The light absorbency when not containing a poly anion and albumin was set to 100, and the decreasing rate of the light absorbency when using what added albumin to each poly anion and each poly anion was obtained as a reaction inhibition rate with respect to each lipid fraction. A result is shown in Table1, Table2. In addition, the symbols of each substance are the following meaning.

DS: デキストラン硫酸  
ALB: 血清アルブミン。

DS: Dextran sulfuric acid  
ALB: Serum albumin.

P: リンタングステン酸ナトリウム  
HP: ヘパリンナトリウム  
PEG: ポリエチレングリコール  
n-OTG: n-オクチル-β-D-チオグルコシド

P: Tungstophosphoric acid sodium  
HP: Heparin sodium  
PEG: Polyethyleneglycol  
N-OTG: n-octyl-β-D-thio glucoside

CHE: コレステロールエステラーゼ  
CHO: コレステロールオキシダーゼ  
POD: ペルオキシダーゼ  
ESPT: N-エチル-N-スルホプロピル-m-トルイジン

CHE: Cholesterol esterase  
CHO: Cholesterol oxidase  
POD: Peroxidase  
ESPT: N-ethyl-N-sulfo propyl-m-toluidine

【0026】

[0026]

【表1】

[TABLE 1]

ポリアニオン	濃度	HDL 阻害率	LDL 阻害率	VLDL 阻害率
DS	0.5mM	2%	64%	31%
P	0.5mM	1%	28%	18%
HP	50U/ml	1%	35%	24%
PEG	0.5mM	0%	5%	3%
Poly anion	Concentration	HDL inhibition rate	LDL inhibition rate	VLDL inhibition rate
DS	0.5 mM	2%	64%	31%
P	0.5 mM	1%	28%	18%
HP	50U/ml	1%	35%	24%
PEG	0.5 mM	0%	5%	3%

【0027】

[0027]

【表2】

[TABLE 2]

ポリアニオン	濃度	アルブミン(%)	HDL 阻害率	LDL 阻害率	VLDL 阻害率
DS	0.5mM	2%	4%	97%	98%
P	0.5mM	2%	2%	44%	64%
HP	50U/ml	2%	3%	56%	34%
PEG	0.5mM	2%	1%	9%	7%
DS	0.5mM	0.02%	2%	67%	45%
DS	0.5mM	0.1%	2%	78%	57%
DS	0.5mM	0.2%	2%	81%	68%
DS	0.5mM	1%	2%	92%	90%
DS	0.5mM	10%	5%	94%	95%
HP	0.5mM	5%	4%	65%	57%
Poly anion	Concentration	Albumin(%)	HDL inhibition rate	LDL inhibition rate	VLDL inhibition rate
DS	0.5 mM	2%	4%	97%	98%
P	0.5 mM	2%	2%	44%	64%
HP	50U/ml	2%	3%	56%	34%
PEG	0.5 mM	2%	1%	9%	7%
DS	0.5 mM	0.02%	2%	67%	45%
DS	0.5 mM	0.1%	2%	78%	57%
DS	0.5 mM	0.2%	2%	81%	68%
DS	0.5 mM	1%	2%	92%	90%
DS	0.5 mM	10%	5%	94%	95%
HP	0.5 mM	5%	4%	65%	57%

## 【0028】

表1、表2の結果より、HDL以外のリポ蛋白を凝集させてHDL-コレステロールを測定する反応系において、一定量以上のALBの添加によってLDL及びVLDLを十分阻害していることがわかる。特にALBとDSとの組み合わせが効果的であった。これにより、HDLフラクションのコレステロールを精度良く正確に測定することができる。

## 【0029】

## 実施例3: 反応経時変化

0.5mMのDS、2.0%のALB、20mMの塩化マグネシウム、0.2%のn-OTG及び1mMのESPTを含む50mMのビスートリス緩衝液(pH7.0)0.75mlに、試料として、血清10 $\mu$ lを加え、37°Cで5分間加温した。これに0.5mMの4-AP、20 $\mu$ g/mlのPOD、各5u/mlのCHE及びCHOを含む50mMのビスートリス緩衝液(pH7.0)0.25mlを添加し、37°Cで5分間加温した後の波長546nmでの吸光度変化を測定した。血清に換えてHDL-コレステロール標準品について同様の操作を行い、血清中のHDL-コレステロール値を求めた。また、ALBを除いたものを用いて同様の操作を行い対照とした。他方、同じ検体についてゲルろ過カラムによる反応液体クロマトグラフィー法(HPLC法、W, Marz等, Clin.

## 【0028】

In the reaction system which is made to aggregate lipoprotein other than HDL and measures HDL-cholesterol from the result of Table1, Table2, it turns out that LDL and VLDL are sufficiently inhibited by the addition of ALB more than certain quantity. In particular the combination of ALB and DS was effective. Thereby, cholesterol of HDL fraction can be measured correctly and accurately.

## 【0029】

## Example 3: Reaction over-time change

As a sample, 10 microliter of blood serum was added to 0.75 ml (pH7.0) 50 mM bis-tris buffers which contain DS of 0.5 mM, 2.0% of ALB, magnesium chloride of 20 mM, 0.2% of n-OTG, and 1 mM ESPT, and it heated for 5 minutes at 37 degrees C to them. 0.25 ml (pH7.0) of 50 mM bis-tris buffers which contain each POD of 0.5 mM 4-AP and 20 microgram/ml, and 5 u/ml CHE and CHO in this is added, light-absorbency change with wavelength 546 nm after heating for 5 minutes at 37 degrees C was measured. It changed to the blood serum, the operation same about HDL-cholesterol reference standard was performed, and HDL-cholesterol count in blood serum was obtained. Moreover, the same operation was performed using the thing except ALB, and it was set as the control. On the other hand, a measurement by the reaction liquid

Chem., 39, 2276, 1993)での測定を実施し、その測定値と比較した。また、各測定法での標準物質としては、予め超遠心法で分画したHDLフラクションの総コレステロール値を酵素法で測定したものを用いた。血清10例の測定値を表3に示す。

chromatography method (Clin.Chem., such as HPLC method, W, Marz, 39, 2276, 1993) by gel-filtration column is implemented about the same test substance, compared with the measured value, moreover, what measured the total cholesterol value of HDL fraction beforehand fractionated by the ultra-centrifugal method by the enzyme method as a reference material in each measuring method was used. The measured value of ten units of blood serum is shown in Table 3.

【0030】

【0030】

【表3】

【TABLE 3】

検体	本法	対照法	HPLC法
血清1	38.2	60.5	37.8
血清2	41.3	58.6	40.3
血清3	36.2	75.6	36.2
血清4	16.5	30.1	17.4
血清5	29.2	42.3	28.5
血清6	21.4	58.4	23.7
血清7	32.6	75.1	32.4
血清8	27.9	31.2	26.5
血清9	70.1	109.9	68.9
血清10	43.7	46.2	41.6

単位:mg/dl

Test substance	This method	Control method	HPLC method
Blood serum 1	38.2	60.5	37.8
Blood serum 2	41.3	58.6	40.3
Blood serum 3	36.2	75.6	36.2
Blood serum 4	16.5	30.1	17.4
Blood serum 5	29.2	42.3	28.5
Blood serum 6	21.4	58.4	23.7
Blood serum 7	32.6	75.1	32.4
Blood serum 8	27.9	31.2	26.5
Blood serum 9	70.1	109.9	68.9
Blood serum 10	43.7	46.2	41.6

Unit: mg/dl

## 【0031】

表3の通り、本発明方法は対照法と比較して、HPLC法との相関が良く、血清中のHDL-コレステロールを正確に測定することができる。

## [0031]

As Table 3, compared with the control method, the correlation of a method of this invention with HPLC method is good, and it can measure HDL-cholesterol in blood serum correctly.

## 【0032】

## 【発明の効果】

試料(血清又は血漿)の遠心操作を行うことなく、簡便な操作で、HDL-コレステロールの高精度な測定を行うことができる。

## [0032]

## [ADVANTAGE OF THE INVENTION]

A highly precise measurement of HDL-cholesterol can be performed by convenient operation, without performing centrifugation operation of a sample (a blood serum or plasma).



## THOMSON SCIENTIFIC TERMS AND CONDITIONS

*Thomson Scientific Ltd shall not in any circumstances be liable or responsible for the completeness or accuracy of any Thomson Scientific translation and will not be liable for any direct, indirect, consequential or economic loss or loss of profit resulting directly or indirectly from the use of any translation by any customer.*

Thomson Scientific Ltd. is part of The Thomson Corporation

Please visit our website: ["www.THOMSONDERWENT.COM"](http://www.THOMSONDERWENT.COM) (English)  
["www.thomsonscientific.jp"](http://www.thomsonscientific.jp) (Japanese)